

**CARACTÉRISATION DU DÉBUT DE L'ATRÉSIE  
FOLLICULAIRE ET DE LA HIÉRARCHIE DES  
FOLLICULES DANS L'OVAIRE DE BOVIN**

par:

**Khadija Jebbari**

Thèse présentée au département de Biologie en vue de  
l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph. D.)

**FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

*Sherbrooke, Québec, Canada  
Octobre, 1996*



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*Our file* *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21854-6

## Sommaire

Le projet de recherche visait à améliorer nos connaissances sur le développement folliculaire par vagues chez le bovin et à mieux comprendre le phénomène de la sélection du follicule dominant. Pour cela, la première partie de nos travaux de recherche était consacrée à caractériser de façon rigoureuse le début de l'atrésie folliculaire. Nous avons alors recherché des paramètres susceptibles de bien refléter l'état du follicule. Ainsi, nous avons réalisé une première étude chez les follicules de moyenne (5 à 7,9 mm) et de grande taille ( $\geq 8$  mm) provenant d'ovaires recueillis à l'abattoir. Lors de cette étude, nous avons établi un maximum de 5 pycnoses dans la granulosa comme nombre limite par section folliculaire pour définir les follicules non atrésiques et un nombre de 10 à 25 pycnoses associées à la présence de 25 à 30 prépycnoses par section folliculaire dans la granulosa pour les follicules en début de l'atrésie. Ensuite, nous avons tenté d'établir une corrélation entre ces critères histologiques et des critères physiologiques dans les follicules. Pour cela, nous avons effectué une première expérience où nous avons montré que l'épaisseur de la thèque interne ne change pas avec l'état du follicule et que celle de la granulosa ne change pas avec le début de l'atrésie. L'estradiol-17 $\beta$  ( $E_2$ ), l'androstènedione (A) et la progestérone ( $P_4$ ) du liquide folliculaire ne sont pas des bons indicateurs du début de l'atrésie dans les deux classes folliculaires. Chez les follicules de moyenne taille, les deux rapports molaires  $E_2/A$  et  $E_2/P_4$  du liquide folliculaire ne reflètent pas l'apparence microscopique du follicule. Par contre chez les follicules de grande taille, ces deux rapports molaires diminuent de façon significative dès le début de l'atrésie. De plus, chez ces follicules, les rapports molaires

$E_2/A > 1$  surtout et  $E_2/P_4 > 0,1$  aussi, sont des bons indicateurs du début de l'atrésie. En effet, parmi les follicules de grande taille, la proportion des follicules ayant un rapport molaire  $E_2/A > 1$  subit une chute brutale dès le début de l'atrésie. D'autre part, nous avons effectué une deuxième expérience où nous avons mis les follicules (individuellement) en culture stationnaire pendant une courte durée (4 heures). Lors de cette expérience nous avons montré que les follicules de grande taille seulement, qui débutent l'atrésie, synthétisent moins de testostérone en culture que les follicules non atrésiques. Mais la synthèse *in vitro* d'estradiol-17 $\beta$  par le follicule ainsi que le contenu de ce stéroïde dans le liquide folliculaire, ne sont pas de bons indicateurs du début de l'atrésie chez les moyens et les gros follicules. Enfin la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation, est un excellent indicateur du début de l'atrésie pour les deux classes folliculaires. En effet, la relâche *in vitro* de ce stéroïde subit une chute draconienne dès le début de l'atrésie. Cette baisse est d'environ 50 % pour les moyens follicules et 90 % pour les gros follicules.

La deuxième partie de nos travaux de recherche était consacrée à la caractérisation de la hiérarchie folliculaire au sein de la paire d'ovaires. Pour ce faire nous avons, dans un premier temps, établi un modèle d'étude à partir des ovaires d'abattoir. Ce modèle est basé sur l'apparence du corps jaune et la présence ou non de follicule dominant (FD) sur la paire d'ovaires. Nous avons utilisé ce modèle dans deux études complémentaires. La première était réalisée sur tous les follicules ( $\geq 5$  mm de diamètre) de la paire d'ovaires, juste après leur dissection. La deuxième portait aussi sur tous les follicules ( $\geq 5$  mm de diamètre) de la paire d'ovaires après culture stationnaire des follicules (individuellement) pendant une courte durée (4 heures). Dans les deux



études, nous avons classé les follicules comme étant sains ou atrophiques en utilisant les critères histologiques que nous avons établis dans la première partie de nos travaux de recherche. Ainsi, nous avons établi que le stade I correspond au début du cycle en absence de FD sur la paire d'ovaires. Le stade II représente le début avancé du cycle en présence d'un FD unique et histologiquement non atrophique. Le stade III est le milieu du cycle où un seul FD est présent sur la paire d'ovaires. Ce FD est histologiquement atrophique. Les stades IV et V correspondent aux milieu et fin du cycle respectivement où deux FD sont présents sur la paire d'ovaires. L'un est histologiquement non atrophique, l'autre atrophique. Nous avons montré que les FD non atrophiques sont physiologiquement actifs. En effet, ils sont plus riches en estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire, synthétisent plus de testostérone, et relâchent plus d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation que les FD atrophiques que nous avons nommés alors physiologiquement inactifs. D'autre part, dans les paires d'ovaires de stade I et de stade III (absence de FD et présence d'un FD atrophique respectivement), la grande majorité des follicules subordonnés (FS) sont histologiquement non atrophiques. Par contre, dans les paires d'ovaires des stades II et IV+V (présence d'un FD non atrophique et présence de deux FD, l'un non atrophique, l'autre atrophique, respectivement), la grande majorité des FS sont histologiquement atrophiques. Par ailleurs, les FS de stade I (absence de FD) et de stade III (présence d'un FD unique et atrophique), sont similaires pour la synthèse folliculaire de testostérone, le contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  et sa relâche dans le milieu d'incubation. Toutes ces caractéristiques physiologiques des FS sont par contre supérieures à celles des FS de stade II (présence d'un FD unique et non atrophique). Enfin, le FS non atrophique de stade I ou III le plus riche en estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire, et non le

plus gros de la paire d'ovaires, relâche significativement près de trois fois plus d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation que les autres FS non atrésiques de la cohorte. Ce FS pourrait être le futur FD.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Pr Pierre Matton pour la confiance qu'il m'a témoignée en m'accueillant dans son laboratoire, et pour avoir su diriger mon travail avec beaucoup de patience et de sympathie. Il a aussi bien veillé à m'accorder une bonne formation en subventionnant mes participations aux différents congrès scientifiques qui ont eu lieu durant ces cinq années en Amérique du nord. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude et de ma respectueuse considération.

Il m'est agréable de remercier mes conseillers, les professeurs, Louis Guilbault, Adrien Beaudoin et Brian Talbot, pour leurs encouragements et pour les conseils judicieux qu'ils ont bien voulu me donner à chaque fois que j'en avais besoin, afin que je chemine le plus rapidement et le plus efficacement possible. Je remercie particulièrement le Pr Louis Guilbault pour ces conseils à propos des analyses statistiques. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie également le Pr. Jacques Dufour d'avoir accepté aimablement de juger cette thèse à titre d'examineur externe.

Dans ma dette de reconnaissance, j'associerai le Dr Maryse Picher pour sa contribution dans les corrections du texte de cette thèse. Lors de nos entretiens pour cet effet, j'ai pu

apprécier non seulement ses grandes compétences scientifiques mais aussi ses remarquables qualités humaines. Qu'elle soit assurée de ma profonde considération et de mes sincères remerciements.

Je ne manquerais pas de remercier mesdames Johanne Hallée, Nancy Dyke et Nathalie Breton pour l'aide technique qu'elles m'ont apportée. Du côté humain, j'aimerais les remercier pour tous les moments agréables que nous avons passés ensemble au laboratoire. Merci à tous ceux du département de Biologie de l'Université de Sherbrooke, qui ont contribué de près ou de loin au succès de ce travail. L'estime que j'ai pour chacun d'entre vous est grand et soyez assurés de ma plus vive reconnaissance.

Ces remerciements seraient incomplets si l'importance et l'intensité du rôle de ma petite famille durant ces années n'étaient pas mentionnées. Mon époux Anouar Jorio, pour les sacrifices inestimables qu'il a faits, la patience et l'endurance qu'il m'a toujours réservées pour que nous atteignions tous les deux nos objectifs. Ma fille Meryem pour sa grande patience et sa sagesse et mon fils Amine qui m'a d'abord accompagné tout au long de la rédaction de cette thèse avant de voir le jour. Pour toute ma petite famille, je souhaite que cette thèse soit un gage de jours meilleurs.

J'aimerais profiter de la fin de mes études pour exprimer mes remerciements les plus sincères à toute ma famille et ma belle famille pour leur grand soutien moral. Mon père et ma

mère qui ont toujours veillé à ce que j'aboutisse dans mes études et ce, par leurs sacrifices inestimables et leur grand support moral et matériel. Par leur exemple de vie, ils m'ont inculqué une bonne philosophie de vie et de travail. Mon frère aîné Hakam et ma belle soeur Annie Vincourt qui m'ont toujours facilité les démarches pour réaliser mes projets et ce, dès le début de mes études graduées en France par leur soutien moral et matériel. Ma mère, ma soeur Bouchra et mon beau frère Kamal Sayarh pour le soin remarquable qu'ils ont apporté en mon absence à ma petite famille et en particulier à mes enfants à chaque fois qu'ils en avaient besoin et ce, pour que je puisse achever la rédaction de ma thèse. Ma belle mère Latifa Rouane pour tout ce qu'elle a fait pour moi et pour mon époux. Mon beau frère Maâti Jorio pour ses encouragements et son appui moral. Enfin, ma belle soeur Hasnaa Jorio pour sa présence parmi nous au Canada et ses encouragements. Veuillez trouver aujourd'hui en cette thèse, l'expression de ma profonde reconnaissance.

Enfin, je tiens à remercier l'agence canadienne de développement internationale (ACDI) et l'Université de Sherbrooke pour la bourse d'étude qu'ils m'ont offerte afin que je puisse réaliser mes études doctorales. Je remercie également l'organisme qui a subventionné ce projet, le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et les fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (FCAR). Finalement, je remercie tous les membres du département de Biologie de la Faculté des Sciences de l'université Sidi Mohammed Ben Abdellah à Fès au Maroc de m'avoir permis ce stage de longue durée.

## Table des matières

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>ii</b>
<b>REMERCIEMENTS. ....</b>	<b>vi</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS UTILISÉS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xvii</b>

<b>1. INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
1.1 Caractéristiques du cycle estral bovin .....	1
1.2 Contrôle de la maturation des follicules bovins par les gonadotropines.....	8
1.3 Développement de l'atrésie folliculaire .....	12
<i>1.3.1 Critères macroscopiques.....</i>	<i>13</i>
<i>1.3.2 Critères histologiques.....</i>	<i>13</i>
1.3.2.1 Follicules sains ou non-atrétiques (NA).....	14
1.3.2.2 Atrésie primaire (niveau 1 de l'atrésie: A <sub>1</sub> ) .....	14
1.3.2.3 Atrésie secondaire (niveau 2 de l'atrésie: A <sub>2</sub> ).....	15
1.3.2.4 Atrésie tertiaire ou très avancée (niveau 3 de l'atrésie: A <sub>3</sub> ).....	15
1.3.2.5 Atrésie très avancée « luteinisante » (niveau 4 de l'atrésie: A <sub>4</sub> ) .....	15
<i>1.3.3 Critères biochimiques.....</i>	<i>16</i>
<b>2. CARACTERISATION DU DEBUT DE L'ATRESIE FOLLICULAIRE .....</b>	<b>21</b>
2.1 Introduction .....	21
<i>2.1.1 Objectif et hypothèse de travail.....</i>	<i>22</i>
2.2 Matériels et méthodes .....	24
<i>2.2.1 Matériel biologique .....</i>	<i>24</i>

2.2.2 Histologie des follicules.....	24
2.2.3 Critères de l'atrésie .....	25
2.2.3.1 Protocole expérimental.....	25
2.2.3.2 Évaluation microscopique des différents états folliculaires .....	25
2.2.4 Culture stationnaire.....	27
2.2.5 Mesure de la synthèse de novo: établissement des conditions adéquates de culture de follicule.....	29
2.2.5.1 Protocole expérimental.....	29
2.2.5.2 Résultats.....	31
2.2.5.2.1 Durée de la culture .....	31
2.2.5.2.2 Précurseur <sup>14</sup> C androstènedione .....	31
2.2.5.2.3 Concentration de FSH.....	32
2.2.6 Technique d'extraction pour dosage RIA .....	32
2.2.7 Dosage des hormones par radioimmunoétalonnage (RIA) .....	33
2.2.8 Validation des dosages d'hormones stéroïdes (par RIA) sans extraction du liquide folliculaire .....	33
2.2.9 Technique d'extraction pour chromatographie en couches minces.....	35
2.2.10 Chromatographie en couches minces.....	36
2.2.11 Mesure de l'épaisseur de la thèque interne et de la granulosa selon l'état du follicule .....	36
2.2.12 Mesure du contenu du liquide folliculaire en stéroïdes selon l'état du follicule .....	37
2.2.13 Synthèse in vitro des stéroïdes selon l'état du follicule.....	38
2.2.14 Analyses statistiques .....	39
2.3 Résultats .....	48
2.3.1 Effet de l'état du follicule sur l'épaisseur de la thèque interne et de la granulosa .....	48
2.3.2 Effets de l'état du follicule sur le contenu du liquide folliculaire en stéroïdes.....	49
2.3.2.1 Estradiol-17β.....	49

2.3.2.2 Androstènedione .....	49
2.3.2.3 Progestérone .....	50
2.3.3 Effets de l'état du follicule sur les Rapports molaires $E_2/A$ et $E_2/P_4$ .....	50
2.3.4 Répartition des follicules estrogènes actifs selon leurs états.....	51
2.3.4.1 Activité estrogène définie par le rapport molaire $E_2/A$ .....	51
2.3.4.2 Activité estrogène définie par le rapport molaire $E_2/P_4$ .....	51
2.3.5 Effet de l'état du follicule sur la synthèse des stéroïdes.....	52
2.3.5.1 $^{14}C$ testostérone.....	52
2.3.5.2 $^{14}C$ estradiol-17 $\beta$ et $^{14}C$ estrone .....	53
2.3.6 Effet de l'état du follicule sur le contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$ total après culture des follicules .....	53
2.3.7 Effet de l'état du follicule sur la relâche d'estradiol-17 $\beta$ total dans le milieu d'incubation .....	53
2.4 Discussion.....	66
2.4.1 Caractéristiques histologiques de l'état folliculaire.....	66
2.4.2 Influence de l'état du follicule sur l'épaisseur de la thèque interne.....	67
2.4.3 Influence de l'état du follicule sur l'épaisseur de la granulosa .....	68
2.4.4 Teneur hormonale et état folliculaire.....	69
2.4.5 Rapports molaires $E_2/A$ et $E_2/P_4$ et répartition des follicules selon leur état et leur activité estrogène définie par la valeur des rapports $E_2/A$ et $E_2/P_4$ .....	72
2.4.6 Activités de synthèse hormonale par le follicule en culture selon son état histologique.....	75
2.4.7 Relâche d'estradiol-17 $\beta$ total dans le milieu d'incubation selon l'état du follicule .....	78
<b>3. CARACTERISATION DE LA HIERARCHIE DES FOLLICULES DANS L'OVAIRE DE BOVIN .....</b>	<b>82</b>
3.1 Introduction.....	82
3.1.1 Objectif de travail.....	83



3.2 Matériel et méthodes.....	83
3.2.1 <i>Matériel biologique</i> .....	83
3.2.2 <i>Hiérarchie folliculaire sans culture des follicules</i> .....	83
3.2.3 <i>Hiérarchie folliculaire après culture des follicules</i> .....	85
3.3 Hiérarchie folliculaire sans culture des follicules .....	92
3.3.1 <i>Resultats</i> .....	92
3.3.2 <i>Présence et statut histologique du follicule dominant durant le cycle estral</i> .....	92
3.3.3 <i>Concentration des stéroïdes dans le liquide folliculaire des follicules dominants selon leur statut</i> .....	92
3.3.4 <i>Influence de la présence et du statut histologique du follicule dominant sur la répartition des follicules subordonnés selon leur état, durant le cycle estral</i> .....	93
3.3.5 <i>Influence de la présence et du statut histologique du follicule dominant sur les concentrations du liquide folliculaire des follicules subordonnés en estradiol-17<math>\beta</math> et en androstènedione</i> .....	93
3.4 Hiérarchie folliculaire après culture des follicules.....	94
3.4.1 <i>Résultats</i> .....	94
3.4.2 <i>Structure des cellules de la granulosa après ou sans culture des follicules</i> .....	94
3.4.3 <i>Présence et statut histologique du follicule dominant durant le cycle estral</i> .....	95
3.4.4 <i>Influence de la présence et du statut histologique du follicule dominant sur la répartition des follicules subordonnés selon leur état après culture</i> .....	95
3.4.5 <i>Production folliculaire en stéroïdes, contenu du liquide folliculaire et relâche d'estradiol-17<math>\beta</math> dans le milieu de culture après 4 heures d'incubation</i> .....	96
3.4.5.1 <i>Follicules dominants</i> .....	96
3.4.5.2 <i>Influence de la présence et du statut histologique du FD sur les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés</i> .....	96

3.4.6 Critères de détection du futur FD au sein de la cohorte des follicules en croissance.....	98
3.4.6.1 Influence du diamètre.....	98
3.4.6.2 Follicule subordonné de la paire d'ovaires qui est non atrésique et le plus riche en estradiol-17 $\beta$ du liquide folliculaire.....	98
3.4.7 Influence de la présence du FD sur les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés non atrésiques.....	99
3.4.8 Influence du début de l'atrésie sur les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés.....	99
3.5 Discussion.....	112
3.5.1 Validation du modèle utilisant les ovaires d'abattoir pour l'étude de la hiérarchie folliculaire.....	112
3.5.2 Influence de la présence et du statut du FD sur le taux d'atrésie des follicules subordonnés.....	116
3.5.3 Influence de la présence et du statut du FD sur les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés.....	118
3.5.4 Sélection du futur follicule dominant.....	123
<b>4. CONCLUSION .....</b>	<b>130</b>
<b>5. ANNEXE: ETUDE DES CONDITONS OPTIMALES DE STIMULATION DES FOLLICULES BOVINS EN CULTURE DE LONGUE DUREE .....</b>	<b>133</b>
<b>6. BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>138</b>

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS UTILISÉS

A:	Androstènedione
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
BSA :	" Albumine Sérique Bovine "
CCM	Chromatographie en couches minces
CPM :	Comptes par minute
E <sub>2</sub> :	Estradiol
FD :	Follicule dominant
FS :	Follicule subordonné
FSH :	Folliculotropine (c'est-à-dire hormone folliculostimulante, d'origine ovine)
GnRH :	« Gonadotropin releasing Hormone »
IGF-1 :	"Insulin-like growth factor-1" (facteur de croissance insulinique de type-1)
IGFBP :	"Insulin like growth factor binding protein" (protéine de liaison de IGF)
LH :	Lutropine
P <sub>4</sub> :	Progestérone
T :	Testostérone

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Coupes transversales de follicules normaux: N (I et III) et en début de l'atrésie: A <sub>1</sub> (II et IV). Photos I et II (346×). Photos III et IV (1690×). A = Antre, G = Granulosa., T = Thèque interne, P = Pycnose, PP = Prépycnose. ....	41
Figure 2	Coupes transversales de follicules en début de l'atrésie: A <sub>1</sub> (1690×). A = Antre, G = Granulosa., T = Thèque interne, P = Pycnose, PP = Prépycnose. ....	42
Figure 3	Coupes transversales de follicules en atrésie avancées: A <sub>2</sub> (photo du haut) et en atrésie très avancées: A <sub>3</sub> (photo du bas) (676×). A = Antre, G = Granulosa., T = Thèque interne, P = Pycnose.....	43
Figure 4	Effet de la durée de la culture sur la production des stéroïdes mesurée dans le volume total du milieu de culture et du liquide folliculaire pour les deux classes folliculaires.....	44
Figure 5	Effet de <sup>14</sup> C androstènedione sur la production des stéroïdes mesurée dans le volume total du liquide folliculaire et du milieu de culture pour les deux classes folliculaires.....	45
Figure 6	Effet de la FSH sur la production des stéroïdes mesurée dans le volume total du liquide folliculaire et du milieu de culture pour les deux classes folliculaires. ....	46
Figure 7	Comparaison des concentrations hormonales mesurées dans le liquide folliculaire après ou sans extraction. ....	47
Figure 8	Epaisseur de la thèque interne et de la granulosa en fonction de l'état du follicule pour les deux classes folliculaires.....	61
Figure 9	Concentration d'estradiol-17β, d'androstènedione et de progestérone mesurées dans le liquide folliculaire en fonction de l'état du follicule pour les deux classes folliculaires.....	62

Figure 10	Rapport molaire des hormones stéroïdes du liquide folliculaire en fonction de l'état du follicule pour les deux classes folliculaires.....	63
Figure 11	Concentration des hormones nouvellement synthétisées mesurées dans le volume total de milieu de culture et du liquide folliculaire en fonction de l'état pour les deux classes folliculaires. ....	64
Figure 12	Concentration en estradiol-17 $\beta$ total (estradiol-17 $\beta$ + $^{14}\text{C}$ estradiol-17 $\beta$ ) mesurée dans le liquide folliculaire et le milieu de culture en fonction de l'état pour les deux classes folliculaires.....	65
Figure 13	Coupes transversales de follicules normaux montrant les cellules de la granulosa (1690 $\times$ ). ....	101
Figure 14	Modèle de hiérarchie folliculaire dans l'ovaire de bovin durant le cycle estral. ....	129

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Classification des follicules bovins en fonction de leur taille. ....	3
Tableau 2	Description des follicules présents sur la paire d'ovaires à différents jours du cycle chez des vaches à 2 vagues de développement folliculaire chez le bovin (tiré à partir des résultats graphiques de Pierson et Ginther, 1984; 1986; 1987a; 1987b; 1988b) .....	6
Tableau 3	Description des follicules présents sur la paire d'ovaires à différents jours du cycle chez des vaches à 3 vagues de développement folliculaire chez le bovin (tiré à partir des résultats graphiques de Pierson et Ginther, 1984; 1986; 1987a; 1987b; 1988b) .....	7
Tableau 4	Variation des teneurs de $E_2$ , $P_4$ , testostérone et androstènedione dans le fluide folliculaire de follicules de différentes classes de taille avec l'atrésie du follicule bovin .....	20
Tableau 5	Les principaux critères histologiques des différents états folliculaires. ....	40
Tableau 6	Niveau de probabilité associé aux effets de l'état du follicule sur l'épaisseur de la thèque interne et de la granulosa, pour les deux classes folliculaires. ....	55
Tableau 7	Niveau de probabilité associé aux effets de l'état du follicule sur la concentration et les rapports molaire des hormones stéroïdes du liquide folliculaire pour les deux classes folliculaires. ....	56
Tableau 8	Répartition des follicules estrogènes actifs et inactifs par le rapport molaire $E_2/A$ en fonction de l'état du follicule. ....	57
Tableau 9	Répartition des follicules estrogènes actifs et inactifs par le rapport molaire $E_2/P_4$ en fonction de l'état du follicule. ....	58
Tableau 10	Répartition des follicules de classe 2 en fonction du rapport molaire $E_2/P_4$ ( $< 0,1$ ou $> 0,1$ ) et de l'état du follicule. ....	59

Tableau 11	Niveau de probabilité associé aux effets de l'état folliculaire sur la synthèse hormonale du follicule (liquide folliculaire plus milieu de culture), sur la concentration du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$ total et sa relâche <i>in vitro</i> pour les deux classes folliculaires. ....	60
Tableau 12	Estimation de la période du cycle par l'aspect du corps jaune et la présence ou non d'au moins un gros follicule de diamètre > 11 mm (FD). Adapté d'après les travaux de Ireland et al. (1980). ....	89
Tableau 13	Répartition des follicules $\geq 5$ mm étudiés selon le stade du cycle et l'état de la paire d'ovaires. ....	90
Tableau 14	Répartition des follicules $\geq 5$ mm étudiés selon le stade du cycle et l'état de la paire d'ovaires (follicules destinés à la culture). ....	91
Tableau 15	Répartition des follicules (FS) (nombre) selon leur état et selon la présence et le statut histologique du follicule dominant (FD) durant le cycle estral. ....	102
Tableau 16	Effet du statut histologique <sup>1</sup> du follicule dominant FD sur sa concentration en estradiol-17 $\beta$ et en androstènedione mesuré dans le liquide folliculaire. ....	103
Tableau 17	Effet de la présence et du statut histologique et physiologique du follicule dominant (FD) sur la concentration en estradiol-17 $\beta$ et en androstènedione du liquide folliculaire des follicules subordonnés (FS). ....	104
Tableau 18	Répartition des follicules subordonnés (FS) (nombre) selon leur état et selon la présence et le statut histologique du follicule dominant (FD) à différents stades du cycle estral. ....	105
Tableau 19	Effets du statut histologique <sup>1</sup> du follicule dominant FD sur la production des stéroïdes et la concentration du liquide folliculaire et du milieu de culture en estradiol-17 $\beta$ total. ....	106
Tableau 20	Effets de la présence et du statut histologique et physiologique du follicule dominant (FD) <sup>1</sup> sur la production des follicules subordonnés	

	(FS) en stéroïdes et la concentration de ces derniers en estradiol-17 $\beta$ total du liquide folliculaire et du milieu de culture. ....	107
Tableau 21	Comparaison des stéroïdes du follicule subordonné (FS) histologiquement <sup>1</sup> non atrésique le plus gros de la paire d'ovaires avec ceux des autres FS non atrésiques en absence d'un follicule dominant (FD) ou en présence d'un FD histologiquement <sup>1</sup> atrésique et physiologiquement inactif. ....	108
Tableau 22	Comparaison des stéroïdes du follicule subordonné (FS) histologiquement <sup>1</sup> non atrésique le plus riche en estradiol-17 $\beta$ (liquide folliculaire) dans la paire d'ovaires avec ceux des autres FS non atrésiques en absence d'un follicule dominant (FD) ou en présence d'un FD histologiquement atrésique et physiologiquement inactif. ....	109
Tableau 23	Effets de la présence du follicule dominant (FD) sur la production des follicules subordonnés (FS) <sup>1</sup> non atrésiques en stéroïdes et la concentration de ces derniers en estradiol-17 $\beta$ total du liquide folliculaire et du milieu de culture. ....	110
Tableau 24	Effet du début de l'atrésie sur la production en stéroïdes et la concentration en estradiol-17 $\beta$ total du liquide folliculaire et du milieu de culture des FS <sup>1</sup> des stades II+III+IV+V (périodes du cycle où au moins un follicule dominant (FD) est présent). ....	111



# **1. Introduction générale**

## **1.1 Caractéristiques du cycle estral bovin**

L'industrie du transfert d'embryons souffre actuellement d'un manque de cohérence dans la réponse des vaches au traitement de suroovulation. L'amélioration des techniques qui visent à optimiser la fertilité des bovins nécessite une meilleure compréhension des caractéristiques du cycle estral et des facteurs qui influencent la maturation des follicules.

Le cycle estral comprend trois étapes: la maturation des follicules de l'ovaire (phase folliculaire), l'ovulation et les modifications apportées au myomètre de l'utérus pour accueillir l'embryon (phase lutéale). Chez la vache, la phase lutéale est d'une durée moyenne de 18 jours et la phase folliculaire d'une durée moyenne de 3 jours. L'estrus a lieu le 20<sup>ème</sup> jour du cycle et l'ovulation quelques dizaines d'heures plus tard (Hansel et Convey, 1983; Peters et Ball, 1987). Le cycle estral des bovins a de particulier que des follicules dominants se développent non seulement durant la phase folliculaire, mais aussi durant la phase lutéale. Plusieurs techniques ont été utilisées pour suivre le développement des follicules de l'ovaire de la vache, notamment le dénombrement des follicules à la surface ovarienne après ovariectomie (Rajakoski, 1960), l'histologie (Rajakoski, 1960; Maurasse et al., 1985; Lussier et al., 1987), le marquage à l'encre de chine (Matton et al., 1981), et enfin l'échographie (Pierson et Guinther, 1987a; Sirois et Fortune

1988; Savio et al., 1988; Knopf et al., 1989; Ginther et al., 1989; Kastelic et al., 1990; Sirois et Fortune, 1990; Guilbault et al., 1991; Murphy et al., 1991). L'échographie permet de suivre le développement d'un follicule tout au long du cycle. L'observation macroscopique de l'ovaire révèle la présence de plusieurs follicules de tailles variées allant de 1 à 20 mm de diamètre. Ces follicules sont classés selon leur taille (tableau 1). En général, les petits follicules mesurent moins de 5 mm de diamètre, et les gros follicules plus de 8 ou 10 mm, selon les auteurs (tableau 1). Cette classification est purement arbitraire et ne repose sur aucune base physiologique. Plus récemment, Kruip et Dieleman (1989) ont confirmé que le diamètre des gros follicules est  $\geq 8$  mm parce que ces follicules ont un patron de relâche de stéroïdes très différent de celui des plus petits follicules.

Le nombre de follicules de différents diamètres n'est pas constant durant le cycle estral (Matton et al., 1981; Pierson et Ginther, 1987a). En effet, les trois classes de tailles de follicules présentent une distribution bimodale (Pierson et Ginther, 1987a, 1987b; Desaulniers, 1995). De plus, les pics de chaque classe ne sont pas atteints au même moment dans le cycle. Par exemple, au jour 6, nous trouvons un maximum de follicules dont la taille est supérieure à 13 mm et un minimum de follicules de 4 à 6 mm et de 7 à 10 mm. De plus le nombre de follicules moyens atteint son maximum au jour 13 (Matton et al., 1981), présumément suite à la croissance du grand nombre de petits follicules présents plus tôt dans le cycle (Matton et al., 1981; Pierson et Ginther, 1987a; 1987b). Ces observations suggèrent que le développement folliculaire chez le bovin se fait sous forme de vagues.

Tableau 1 Classification des follicules bovins en fonction de leur taille.

Auteurs	Tailles folliculaires (mm)		
	Petits	Moyens	Gros
Kruip et al. (1979)	2,5 - 5	5,1 - 8	$\geq 8,1$
Kruip et Dieleman (1985)	2 - 5	5,1 - 8	8,1 - 11 et $> 11$
McNatty et al (1985)	2 - 4,4	5 - 7,5	$> 8$
Matton et al. (1981)	1 - 3	3 - 6	$> 6$
Staigmiller et England (1982)	3 - 5	5,1 - 10	$> 10$
Henderson et al. (1982)	$< 3$	3 - 8	$\geq 8$
Henderson et al. (1987)	$< 5$	$5 \leq < 10$	$\geq 10$
Gosling et al. (1977)	2 - 6	6 - 10	$> 10$

Le modèle de vagues folliculaires a d'abord été évoqué chez la brebis (Bherer et al., 1976; Matton et al., 1977) ensuite chez le bovin (Adelakoun et al., 1977; Matton et al., 1981; Ireland et Roche, 1983b). Depuis 1984, grâce à l'échographie, les chercheurs ont pu établir que plusieurs poussées de croissance et de régression de follicules se produisent durant le cycle estral bovin (revue: Ireland et Roche, 1987). Chaque poussée est nommée vague de croissance folliculaire. En 1987, Ireland et Roche suggèrent pour la première fois qu'une vague comprend trois phases: le recrutement, la sélection et la dominance. Le recrutement se définit comme étant l'entrée en

croissance terminale d'un groupe de follicules de 4 à 5 mm (Godman et Hodgen, 1983; Driancourt, 1991). La phase de sélection se caractérise par l'émergence d'un follicule appelé follicule dominant (FD) qui présente une croissance plus rapide que les autres (tableaux 2 et 3). Il deviendra en principe le follicule ovulatoire (Driancourt, 1991). Le follicule ovulatoire chez la vache est identifié comme le plus gros des follicules présents sur la paire d'ovaires quelques jours avant l'estrus (Dufour et al., 1972; Quirk et al., 1986) ou le plus gros des follicules 24 à 48 heures après injection de prostaglandines (Quirk et al., 1986). Durant la phase de dominance, les follicules < 11 mm appelés follicules subordonnés (FS) cessent de croître quelques jours après la détection de la vague de follicules de 4 à 5 mm (Kastelic et al., 1989). Le follicule dominant parcourt une phase de dominance qui est suivie soit de son atresie, soit de son ovulation. Une vague folliculaire comprend en moyenne, par paire d'ovaires, 16 à 20 petits follicules, 7 ou 8 follicules de taille moyenne et un gros follicule (tableaux 2 et 3).

En général, les vagues folliculaires sont au nombre de deux (Pierson et Ginther, 1984; Kastelic et al., 1989; Knopf et al., 1989; Ginther et al., 1989b) ou de trois (Ireland et Roche, 1987; Savio et al., 1988; Sirois et Fortune, 1988) par cycle estral. Étant donné que l'ovulation a lieu à la fin du cycle estral, quel que soit le nombre de vagues dans un cycle, la vague ovulatoire est toujours la dernière. Ginther et al. (1989) ont montré qu'il n'y a pas de différence significative entre la vague ovulatoire et les vagues anovulatoires quant au nombre de follicules de taille moyenne (4 - 6 mm) en croissance ou en régression. De plus, le follicule dominant des vagues anovulatoires destiné normalement à l'atresie renferme le potentiel d'ovuler si l'environnement

endocrinien est modifié, de telle sorte qu'il y a un pic de LH (endogène ou exogène) (Lavoir et Fortune, 1990).

Tableau 2 Description des follicules présents sur la paire d'ovaires à différents jours du cycle chez des vaches à 2 vagues de développement folliculaire chez le bovin (tiré à partir des résultats graphiques de Pierson et Ginther, 1984; 1986; 1987a; 1987b; 1988b)

Jours du cycle estral			
Jour 3: <i>Sélection visible</i> du FD de vague 1	Jour 12: <i>Sélection visible</i> du FD de vague 2	Entre jour 13 et jour 16	Jour 20
- Présence de 16 à 22 follicules de 2 à 3 mm.	- idem	- idem	- idem
- 7 à 8 follicules de 4 à 6 mm	- idem	- idem	- 9 à 10 follicules de 4 à 6 mm
- 1 follicule de 7 à 10 mm	- 1 follicule de 7 à 10 mm en croissance plus un follicule d'environ 14 mm en régression	- à un moment donné: présence de 2 follicules de même taille ayant 9 à 13 mm (l'un en croissance, l'autre en régression)	- 1 follicule d'environ 17 mm en croissance

Tableau 3 Description des follicules présents sur la paire d'ovaires à différents jours du cycle chez des vaches à 3 vagues de développement folliculaire chez le bovin (tiré à partir des résultats graphiques de Pierson et Ginther, 1984; 1986; 1987a; 1987b; 1988b)

Jour du cycle estral				
Jour 3: <i>Sélection visible</i> du FD de vague 1	Jour 11: <i>Sélection visible</i> du FD de vague 2	Entre jour 14 et jour 17	Jour 16: <i>Sélection visible</i> du FD de vague 3	Jour 20 - 21
-Présence de 16 à 22 follicules de 2 à 3 mm	- idem	- idem	- idem	- idem
- 7 à 8 follicules de 4 à 6 mm	- idem	- idem	- idem	- 9 à 10 follicules de 4 à 6 mm
- 1 follicule de 7 à 10 mm	- 1 follicule de 7 à 10 mm en croissance plus un follicule de 12 à 15 mm en régression	- à un moment donné: présence de 2 follicules de même taille ayant 9 à 13 mm: l'un en croissance, l'autre en régression.	- 1 follicule de 7 à 10 mm en croissance plus 1 follicule de 10 à 16 mm en régression	- 1 follicule d'environ 17 mm en croissance

## **1.2 Contrôle de la maturation des follicules bovins par les gonadotropines**

L'hypophyse antérieure produit deux hormones impliquées dans le développement des follicules: la lutéotropine (LH) et la folliculotropine (FSH). La LH stimule la production d'androgènes et induit l'ovulation, alors que la FSH stimule la production d'estrogènes par l'activité aromatasase (Lacroix et al., 1974). Les gonadotropines influencent le développement des follicules en se liant à des récepteurs membranaires. L'abondance relative des différents récepteurs varie avec le type de cellules et la taille des follicules. Chez les gros et moyens follicules les cellules de la thèque interne possèdent des récepteurs à la LH (Fortune et al., 1988), alors que les cellules de la granulosa portent à la fois des récepteurs à la LH (Gosling et al., 1977) et à la FSH (Monniaux et al., 1984). Le nombre de récepteurs à la LH des cellules de la granulosa (Gosling et al., 1977; Ireland et Roche, 1982; Ireland et Roche, 1983a) et de la thèque (Ireland et Roche, 1982; 1983a; Staigmiller et al., 1982) augmente durant le développement du follicule. Par contre, le cas des récepteurs à la FSH ne fait pas l'unanimité. Selon Mariana et al. (1991), le nombre de récepteurs à la FSH dans la granulosa ne varie pas avec la taille des follicules, alors que Ireland et Roche (1982, 1983a) rapportent une diminution linéaire des liaisons à la FSH avec l'augmentation de la taille folliculaire (de 5 à 20 mm). L'acquisition de ces deux types de récepteurs par les cellules de la granulosa est l'un des changements majeurs décrits durant la phase terminale de croissance et de différenciation folliculaire chez le bovin. C'est un indicateur de la maturité du follicule et donc de sa capacité à ovuler en réponse à la décharge préovulatoire de LH (Merz et al., 1981; Ireland et Roche, 1982).



Les gonadotropines interviennent à différentes étapes de la vague de croissance folliculaire. Pendant le recrutement, les follicules deviennent strictement dépendants des gonadotropines (Dufour et al., 1979; Lussier et al., 1994; Driancourt, 1991). Adams et collaborateurs (1992) ont démontré qu'un pic de concentration de la FSH dans le sang précède toujours l'émergence de chaque vague folliculaire chez le bovin. L'administration d'un agoniste de « Gonadotropin releasing Hormone » (GnRH) (Driancourt, 1991) ou l'injection de liquide folliculaire bovin (Turzillo et Fortune, 1990, Lussier et al., 1994) entraîne une diminution de la concentration de FSH et prévient l'augmentation du nombre de follicules de 4 à 6 mm.

Les gonadotropines sont aussi impliquées dans l'émergence du follicule dominant (FD) parmi les gros follicules ( $> 11$  mm). Le processus de sélection implique non seulement la sélection du follicule ovulatoire mais aussi la sélection contre les autres follicules (Pierson et Ginther, 1988b). De nombreuses évidences biochimiques et physiologiques supportent cette hypothèse. Premièrement, Bherer et al. (1976) ainsi que Tsonis et al. (1984) ont montré que la destruction du FD accélère la croissance d'un autre follicule dominant chez la brebis. Lussier et al. (1994) ont aussi démontré que l'ablation de l'ovaire qui porte le FD induit la croissance d'un FD sur l'autre ovaire. De même, chez la vache, l'ablation du FD de la première vague au jour 3 retarde la régression finale du follicule subordonné le plus gros (Ko et al., 1991). De plus, l'ablation du FD au jour 3 ou 5 provoque l'apparition précoce de la deuxième vague et augmente la fréquence d'apparition d'une troisième vague de croissance folliculaire. D'autre part, Saumande et al. (1978), Grasso et al. (1989), Guilbault et al. (1991) et Huhtinen et al. (1992), ont trouvé que la présence d'un FD sur la paire d'ovaires au moment d'initier le traitement

surovulatoire par PMSG ou par FSH diminue la réponse à ce traitement chez la vache. La présence du FD avant le traitement surovulatoire ou au moment de l'initier pourrait altérer la maturation et le processus de croissance des autres follicules pendant la stimulation (Grasso et al., 1989, Guilbault et al., 1991) diminuant ainsi la capacité des petits follicules à croître dans la classe de taille supérieure (Grasso et al., 1989). Ceci se produit surtout lorsque l'apparition du FD a lieu trois jours avant le début du traitement (Guilbault et al., 1991).

Chez la vache, Driancourt (1991) propose deux mécanismes par lesquels le FD inhibe le développement des autres follicules. Selon le premier mécanisme, le plus gros follicule provoquerait une diminution du niveau de FSH plasmatique sous le seuil nécessaire pour maintenir la croissance des autres follicules. Plusieurs auteurs (Quirk et Fortune, 1986; McNeilly et Wallace, 1987; Screenan et al., 1987; Turzillo et Fortune, 1990; Adams et al., 1992) suggèrent que les effets du FD sur le développement folliculaire sont médiés au moins en partie par une altération de la concentration sanguine de FSH. Le liquide folliculaire du FD contiendrait un composé non stéroïdien (Miller et al., 1979; Ireland et al., 1983; Cahill, 1984) pouvant agir sur l'hypophyse ou l'hypothalamus pour réduire la sécrétion de FSH (Ireland et al., 1983), ce qui inhibe la croissance et la maturation des autres follicules (Miller et al., 1979; Cahill, 1984) et retarde ou interrompt la séquence de développement folliculaire, l'estrus et l'ovulation chez les bovins et les ovins (Miller et al., 1979). Il a également été démontré que seule la FSH est éliminée suite à l'injection de liquide folliculaire du FD chez la vache (Screenan et al., 1987; Adams et al., 1992; Lussier et al., 1994), alors que le niveau basal de LH n'est pas affecté (Screenan et al., 1987; Adams et al., 1992). McNeilly et Wallace (1987) ont observé une hausse

temporaire de la sécrétion de la FSH juste après l'arrêt des injections du liquide folliculaire chez la brebis. Ce phénomène serait associé à un retard de l'estrus et à une augmentation significative du taux d'ovulation.

Le deuxième mécanisme évoqué par Driancourt (1991) impliquerait que le FD inhibe directement la croissance des autres follicules en sécrétant dans le sang des substances qui diminuent leur sensibilité à la FSH. Plusieurs chercheurs ont identifié une fraction protéique dans le liquide folliculaire du FD qui supprime la réponse des autres follicules aux gonadotropines (DiZerega et al., 1982, 1983; Kling et al., 1984; Montz et al., 1984; Ono et al., 1986). D'autres études conduites chez le rat (Reichert et al., 1979; Fletcher et al., 1982), le singe (Nandedkar et al., 1992) et le bovin (Sluss et al., 1983, 1984) démontrent que le liquide folliculaire du FD inhibe la liaison de la FSH à son récepteur. En effet, la FSH-BI (FSH binding inhibitor) a été détectée dans le liquide folliculaire du FD de la vache (Sluss et al., 1983) et du porc (Sluss et Reichert, 1984).

Nous savons que pendant la phase de dominance, le niveau circulant de FSH est bas. Pourtant, le FD poursuit sa croissance alors que les follicules subordonnés régressent (Adams et al., 1992). Alors Comment le FD arrive-t-il à survivre dans un environnement hormonal appauvri en FSH? i) Est-ce qu'il reçoit davantage de FSH que les autres follicules? ii) Est-ce qu'il est plus sensible que les autres follicules à l'action de la FSH? Malgré que quelques études montrent une hétérogénéité dans la perméabilité vasculaire en fonction de la taille des follicules (Carson et al.,

1986; Zeleznik et al., 1981), il n'existe aucune evidence qui supporte l'hypothèse que le FD recevrait davantage de FSH que les autres follicules. D'autre part, des travaux effectués chez la brebis, indiquent que le FD serait plus sensible aux concentrations circulantes de FSH à cause de l'augmentation du nombre de récepteurs durant sa maturation (Ireland, 1987; Ireland et Roche, 1987). Nous n'avons donc toujours pas d'évidences qui montrent clairement comment le FD arrive à survivre dans un environnement hormonal pauvre en FSH.

### **1.3 Développement de l'atrésie folliculaire**

La croissance d'un follicule ovarien bovin est continue depuis le stade préantral jusqu'à la phase terminale de croissance qui conduit à l'ovulation ou à l'atrésie (Choudary et al., 1968; Cahill et al., 1979; Sacramuzzi et al., 1980; Matton et al., 1981). L'atrésie est le processus dégénératif par lequel le follicule perd son intégrité morphologique et ses capacités biochimiques et physiologiques. Elle est le destin normal de la plupart des follicules. Ainsi, parmi les 150 000 follicules primordiaux présents à la naissance chez la vache (Erikson, 1966), moins de 100 follicules atteignent la maturité et ovulent durant la vie de l'animal. L'atrésie peut avoir lieu à n'importe quel moment de la croissance folliculaire. Mais, elle est rarement observée dans les follicules préantraux (Cahill et al., 1979) et son incidence augmente en même temps que la taille des follicules antraux (McNatty et al., 1984a; Moor et al., 1984; Dufour et Roy, 1985; Maurasse et al., 1985; Guilbaut et al., 1986; Lussier et al., 1987). Elle se manifeste par un ensemble de changements macroscopiques, histologiques et biochimiques, selon le degré de dégénérescence du follicule.

### **1.3.1 Critères macroscopiques**

Les paramètres macroscopiques utilisés pour détecter l'atrésie sont: le degré de vascularisation de la thèque interne, la couleur, le nombre de cellules de la granulosa, la présence ou l'absence de débris dans le liquide folliculaire et le statut de l'ovocyte (Moor et al., 1978; McNatty et al., 1984a). Ainsi, contrairement au follicule sain, bien vascularisé, luisant, translucide et rosé, le follicule atrésique présente une thèque interne faiblement vascularisée, lui donnant une apparence mate, grise ou blanchâtre. Le follicule contient aussi des débris folliculaires visibles par transparence à l'intérieur du liquide folliculaire. L'ovocyte est soit dégénéré, soit absent (Moor et al., 1978; McNatty et al., 1984a).

### **1.3.2 Critères histologiques**

Les premiers chercheurs qui ont utilisé l'histologie pour décrire les différents états folliculaires se sont basés sur des subdivisions morphologiques très larges (Rajakoski, 1960; Marion et al., 1968; Priedkalns et Weber, 1968). Depuis, la liste des critères histologiques de la classification des follicules s'est considérablement raffinée. Nous présentons une description synthèse des principales modifications des structures microscopiques décrites par plusieurs chercheurs (Kruip et Dieleman, 1982, 1989; Driancourt et al., 1981; Maurasse et al., 1985; Martin, 1986; Grimes et al., 1987).

#### **1.3.2.1 Follicules sains ou non-atrétiques (NA)**

Le follicule est considéré comme sain lorsqu'il présente une granulosa bien organisée (de 10 à 15 couches de cellules) et quelques cellules fragmentées ou pycnotiques avec une membrane basale continue. Les cellules basales de la granulosa sont cylindriques et l'épaisseur de la thèque interne est inférieure à celle de la granulosa. La thèque interne a une orientation parallèle à la membrane basale et l'antra ne renferme aucun débris cellulaire.

#### **1.3.2.2 Atrésie primaire (niveau 1 de l'atrésie: A<sub>1</sub>)**

Les cellules de la granulosa du follicule classé en atrésie primaire sont lâches et elles ont perdu leur apparence granuleuse. La limite de la granulosa est irrégulière, l'antra contient des fragments cellulaires, l'épaisseur de la granulosa varie entre 7 et 10 couches de cellules contenant des noyaux pycnotiques. La thèque interne s'épaissit.

### **1.3.2.3 Atrésie secondaire (niveau 2 de l'atrésie: A<sub>2</sub>)**

La granulosa du follicule en atrésie secondaire a perdu plus de 50% de ses cellules. Ces cellules sont pycnotiques et se retrouvent dans le liquide folliculaire. La granulosa renferme 4 à 5 couches de cellules, souvent très désordonnées. La membrane basale est habituellement absente, et on note la présence de nombreuses pycnoses dans les cellules de la granulosa. La thèque interne est deux à trois fois plus épaisse que la granulosa.

### **1.3.2.4 Atrésie tertiaire ou très avancée (niveau 3 de l'atrésie: A<sub>3</sub>)**

A ce stade, le follicule n'a plus de cellules cylindriques basales et la lame basale est absente. La granulosa contient moins de 3 couches cellulaires désordonnées, dont la plupart sont pycnotiques. La thèque interne peut être mince ou épaisse.

### **1.3.2.5 Atrésie très avancée « luteinisante » (niveau 4 de l'atrésie: A<sub>4</sub>)**

La granulosa du follicule en atrésie très avancée est presque complètement absente. Elle est réduite à un cordon de cellules. Par contre, les cellules du cordon ressemblent à des cellules lutéales. Elles sont grosses et leur cytoplasme est abondant.

### 1.3.3 Critères biochimiques

Plusieurs équipes ont tenté d'établir une relation entre la composition en stéroïdes du liquide folliculaire et le degré de maturation ou de l'atrésie des follicules bovins, déterminés selon des critères macroscopiques (McNatty et al., 1984a) ou microscopiques (Merz et al., 1981; Kruip et Dieleman, 1982; Ireland et Roche, 1983a; Martin, 1986; Grimes et al., 1987; Spicer et al., 1987; Spicer et al., 1988; Rouillier, 1991) (tableau 4). La composition hormonale du liquide folliculaire des follicules moyens non-atrésiques diffère selon les auteurs. Pour certains, il contient davantage de testostérone (T) (30 ng/ml) que de progestérone ( $P_4$ ) (20 ng/ml) et d'estradiol-17 $\beta$  ( $E_2$ ) (7 ng/ml) (McNatty et al., 1984a; Kruip et Dieleman, 1985), alors que Henderson et al. (1982) rapportent davantage d'estradiol et de progestérone que de testostérone. Cependant, ces derniers ont mélangé des liquides folliculaires provenant de follicules sains ou atrésiques. Nous verrons plus loin l'impact de l'atrésie sur le contenu en stéroïdes des follicules. Les gros follicules ( $\geq 8$  mm) bovins non atrésiques synthétisent de grandes quantités d'estrogènes (England et al., 1973; Merz et al., 1981; Staigmiller et al., 1982; Kruip et Dieleman, 1982; Ireland et Roche, 1982; 1983a; McNatty et al., 1984b). La concentration d'estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire est de l'ordre de 40 à 140 ng/ml (Ireland et Roche, 1982, 1983a; McNatty et al., 1984a). Dans le cas des gros follicules non atrésiques (8-11 mm), leur croissance est associée à une augmentation du contenu en estradiol (27 ng/ml) et en progestérone (27 ng/ml), et à une diminution du contenu en testostérone (14 ng/ml) dans le liquide folliculaire (Ireland et Roche, 1982; 1983a; 1983b; McNatty et al., 1984a; Kruip et Dieleman, 1985; Wise et al., 1986). Finalement, les FD ( $> 11$ mm) se distinguent des autres gros



follicules (> 8mm) par une production d'estradiol beaucoup plus élevée (60 ng/ml) (McNatty et al., 1984a). Par conséquent, les rapports molaires  $E_2/T$ ,  $E_2/P_4$  et  $E_2/T+P_4$  des FD sont >1 (Kruip et Dieleman, 1985). Les changements qui surviennent dans la composition en stéroïdes des follicules bovins seraient provoqués par des fluctuations dans l'activité des enzymes de la stéroïdogénèse de la thèque et de la granulosa.

L'atrésie ne semble pas influencer le contenu du liquide folliculaire en testostérone et en androstènedione, ceci indépendamment de la taille des follicules (Ireland et Roche, 1983a; McNatty et al., 1984a; Martin, 1986; Grimes et al., 1987; Rouillier, 1991) (tableau 4). Le début de l'atrésie, n'est pas non plus caractérisé par un changement du contenu en estradiol du liquide folliculaire (Martin, 1986; Grimes et al., 1987). Toutefois, une diminution graduelle de la concentration d'estradiol-17 $\beta$  ( $E_2$ ) dans le liquide folliculaire de toutes les classes de tailles de follicules apparaît dans les follicules en atrésie avancée (Merz et al., 1981; Kruip et Dieleman, 1982; Ireland et Roche, 1983a; McNatty et al., 1984a; Fortune et Hansel, 1985; Kruip et Dieleman, 1985; Martin, 1986; Grimes et al., 1987; Spicer et al., 1988; Mariana et al., 1991). Cependant le liquide folliculaire des FD (> 11 mm) atrésiques ou en début de l'atrésie demeure plus élevé en estradiol ( $E_2$ ) que celui des autres follicules (8-11 mm) (Kruip et Dieleman, 1985).

Plusieurs chercheurs (Ireland et Roche, 1983a; McNatty et al., 1984a; Grimes et al., 1987; Spicer et al., 1987, 1988) ont montré que la dégénérescence du follicule conduit également à une augmentation de la teneur du liquide folliculaire en progestérone ( $P_4$ ), résultats qui n'ont cependant pas été confirmés par Martin (1986) (tableau 4). Suite à ces études, des rapports

élevés de  $E_2/P_4$ ,  $E_2/T$  et  $E_2/P_4+T$  ont été associés à des follicules sains, alors que des rapports plus faibles désignent des follicules atrésiques (Ireland et Roche, 1982; 1983a). Martin (1986) a établi une meilleure corrélation entre l'activité hormonale des follicules et la détection microscopique de l'atrésie en utilisant le rapport  $E_2/A$ . Ainsi, un rapport  $E_2/A > 1$  est associé à un follicule sain estrogène actif, alors qu'un rapport  $E_2/A < 1$  caractérise un follicule atrésique estrogène inactif. En effet, Martin (1986) a trouvé que 81% des follicules estrogènes actifs sont classés non atrésiques par les critères microscopiques et 84% des follicules estrogènes inactifs sont classés atrésiques selon ces mêmes critères. Par conséquent, le rapport  $E_2/A$  semble être un bon critère pour déterminer le début de l'atrésie des moyens et gros follicules.

Le débalancement en hormones stéroïdiennes des follicules est suivi d'une baisse progressive du nombre de récepteurs à la LH des cellules de la thèque (Henderson et al., 1984) et des cellules de la granulosa (Ireland et Roche, 1983b), de même qu'une baisse du nombre de récepteurs à la FSH des cellules de la granulosa des follicules  $> 5$  mm (Merz et al., 1981; Grimes et al., 1987; Spicer et al., 1987). Chez la brebis, ce phénomène est détecté seulement en atrésie avancée (Carson et al., 1979). Ces travaux suggèrent que la perte de sites de liaisons aux gonadotropines serait une conséquence plutôt qu'une cause de l'atrésie (Mariana et al., 1991).

Dans ce chapitre nous avons présenté nos connaissances actuelles en ce qui concerne le développement folliculaire par vague et le contrôle de la maturation des follicules par les gonadotropines. Nous avons également présenté une revue de la littérature concernant le développement de l'atrésie folliculaire. Le reste de la thèse sera consacrée à la caractérisation de

la hiérarchie folliculaire dans les ovaires de la vache (chapitre3). Cette caractérisation sera réalisée après avoir déterminé des outils fiables qui sont les critères d'identification du début de l'atrésie folliculaire (chapitre2).

Tableau 4 Variation des teneurs de E<sub>2</sub>, P<sub>4</sub>, testostérone et androstènedione dans le fluide folliculaire de follicules de différentes classes de taille avec l'atrésie du follicule bovin

	E <sub>2</sub> : Estradiol	P <sub>4</sub> : Progesterone	T: Testostérone	A: Androstènedione
Petits follicules antraux	↓ [5 fois] (2) variation non significative (1)	↑ [2 fois] (1) ne varie pas (8)	ne varie pas (1) ne varie pas (8)	ne varie pas (1) ne varie pas (9)
Follicules antraux de moyenne taille	↓ [1,5 à 2 fois] * (8) ↓ [non significative en atrésie intermédiaire] (7) ↓ [2 fois] (1) ↓ [1,3 fois] * (3) ↓ [18 fois] (4)	↑ [2 fois] (7) ↑ [1,5 fois] (1) ↑ [2 fois] * (3) ↑ [3 fois] (4) ne varie pas (8)	ne varie pas (1, 3, 4, 8)	ne varie pas (1, 4, 9,)
Gros follicules antraux	↓ [1,5 à 2 fois] * (8) ↓ [30 fois] (1) ↓ [1,3 fois] *(3) ↓ [15,30 ou 40 fois] (6) ↓ [18 fois] (4)	↑ [6 fois] (1) ↑ [2 fois] *(3) ↑ [2, 4 ou 5 fois] (6) ↑ [3 fois] (4) ne varie pas (8)	ne varie pas (1, 3, 4, 8)	ne varie pas (1, 6, ,4, 9)
↑ = augmentation      ↓ = diminution      [ ] = estimation du taux de variation      ( ) = auteurs				

\* = pas en début de l'atrésie

XXX = non-étudiés

Auteurs	Tailles (mm) étudiées par les différents auteurs		
	Petits	Moyens	Gros
1 - McNatty et al., 1984a	2 à 4,5	5 à 7,5	≥ 8
2- Kruip et Dieleman, 1982	2 à 5	5 à 8	> 8
3 - Grimes et al., 1987	XXX	> 5	
4 - Ireland et Roche, 1983a	XXX	≥ 6	
5 - Merz et al., 1981	XXX	XXX	≥ 8
6 - Spicer et al., 1988	XXX	XXX	≥ 8
7 - Spicer et al., 1987	XXX	4 à 7,9	XXX
8 - Martin, 1986	3à5,9	6 à 7,9	≥ 8
9 - Rouillier, 1991	2 à 4,4	4,5 à 7,9	> 8

## **2. Caractérisation du début de l'atrésie folliculaire**

### **2.1 Introduction**

L'atrésie folliculaire entraîne des modifications importantes tant au niveau de l'aspect général du follicule que de l'arrangement des couches de cellules et même de sa composition biochimique. Cependant, les observations macroscopiques ne permettent pas d'établir des critères aussi fiables que l'histologie et la biochimie pour distinguer les follicules sains des follicules atrésiques. Par exemple, en utilisant les critères macroscopiques établis par Moor et al. (1978), Martin (1986) rapporte que 54% des follicules de veaux femelles qui présentent une vascularisation bien étendue et à couleur rosée sont classés atrésiques, alors que 71% de follicules dits non atrésiques présentent des signes microscopiques de dégénérescence avancée. D'autre part, 40% des follicules atrésiques à vascularisation appauvrie et de couleur grisâtre ne présentent aucun signe de dégénérescence sous le microscope (Martin, 1986). Cet auteur a trouvé des résultats semblables chez la vache pubère. McNatty et al. (1984a) ont également tenté, mais en vain, de relier l'état macroscopique du follicule à son activité hormonale. Lors d'essais préliminaires, nous n'avons pas non plus réussi à établir une corrélation entre l'état macroscopique et l'état histologique des follicules bovins. Kruip et Dieleman (1982) ont été les seuls à rapporter une bonne corrélation (81%) entre la classification macroscopique et histologique des follicules bovins sains et atrésiques.

L'histologie permet de distinguer clairement les follicules normaux de ceux qui sont en atrophie avancée. Toutefois, les follicules normaux sont histologiquement peu différents de ceux qui sont au début de l'atrophie. Les critères histologiques du début de l'atrophie demeurent alors arbitraires. De plus, le seul critère histologique couramment utilisé pour détecter le début de la dégénérescence des follicules est le dénombrement des noyaux pycnotiques dans la couche de cellules de la granulosa. Ceci pose un grave problème, étant donné que le nombre minimal de noyaux pycnotiques permettant de classer un follicule comme atrophique varie d'un auteur à l'autre. Ce nombre est de 5 pycnoses par section folliculaire (Kruip et Dieleman, 1982 et 1989; Maurasse et al., 1985; Grimes et al., 1987) ou de 1% des cellules de la granulosa par section folliculaire (Martin, 1986). Par conséquent, la détermination du début de l'atrophie ne peut se faire non plus en utilisant les critères histologiques actuels.

### **2.1.1 Objectif et hypothèse de travail**

L'objectif de ce travail est de définir des critères histologiques qui sont en corrélation avec les modifications ou changements physiologiques se produisant au début de l'atrophie. Suite à des études préliminaires effectuées sur plus de 300 follicules, nous avons remarqué l'existence de deux catégories de follicules parmi ceux ayant de 7 à 18 couches de cellules de la granulosa. Dans la première catégorie, les follicules possèdent au plus 5 pycnoses par section folliculaire, alors que les follicules de la deuxième catégorie en possèdent de 10 à 25. En accord avec les systèmes de classification rapportés dans la littérature (Kruip et Dieleman, 1982; 1989; Maurasse et al., 1985; Driancourt et al., 1981; Grimes et al., 1987), nous avons émis l'hypothèse voulant

que les follicules qui possèdent au plus 5 pycnoses par section folliculaire sont considérés non atrésiques, alors que ceux qui possèdent de 10 à 25 pycnoses sont en début de l'atrésie. Lorsque ce nombre devient plus important dans le follicule, nous supposons qu'il est en atrésie avancée ou très avancée. En utilisant ce système de classification, nous avons comparé différents paramètres biochimiques sur des follicules sains et atrésiques. Nous avons mesuré les contenus du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$ , en androstènedione et en progestérone, de même que les rapports molaires E<sub>2</sub>/A et E<sub>2</sub>/P<sub>4</sub> pour tester notre hypothèse. D'autre part, nous proposons que des mesures de synthèses (testostérone, estradiol-17 $\beta$  et estrone) folliculaires et de relâche de stéroïdes (estradiol-17 $\beta$ ) par le follicule puissent permettre d'établir une meilleure corrélation entre les critères histologiques et biochimiques de caractérisation du début de l'atrésie. En effet, du moins pour l'estradiol-17 $\beta$  relâchés *in vitro*, à notre connaissance, peu d'études l'ont considéré en fonction de l'état du follicule (Zimmerman et al, 1985; 1987; Kruip et Dieleman, 1989; Rouillier, 1991; Moor et al., 1973; Hay et al., 1979; Terqui et al., 1988). Mais les études réalisées dans notre laboratoire par Rouillier (1991) ont montré que la concentration de ce stéroïde dans le milieu d'incubation varie moins d'un follicule à l'autre que celle mesurée dans le liquide folliculaire. Ceci nous incite à considérer aussi ce paramètre pour étudier la physiologie des follicules.

## **2.2 Matériels et méthodes**

### **2.2.1 Matériel biologique**

Les ovaires ont été recueillis par paires à l'abattoir; ils ont été rapidement enveloppés dans un chiffon imbibé de saline enrichie d'antibiotiques (0,05 g de Fungizone et 2 g de streptomycine / 500 ml de saline). Ces paires d'ovaires ont été transportées jusqu'au laboratoire à une température de 0°C (glace). Les follicules ont été ensuite disséqués puis leur taille a été mesurée à l'aide d'un vernier. Ils ont été classés en deux classes selon le diamètre: follicule moyen (classe 1 : 5 à 7,9 mm) et gros follicules (classe 2 :  $\geq 8$  mm). Après leur mesure, les follicules ont été maintenus dans un chiffon imbibé de saline physiologique jusqu'au moment de l'incubation ou de leur congélation pour l'étude histologique que nous allons évoquer dans la section suivante. Entre le moment du prélèvement des ovaires et le début de l'incubation ou de la congélation des follicules il s'écoule de 2 à 4 heures comme l'avait fait Rouillier (1991).

### **2.2.2 Histologie des follicules**

Au terme de la dissection ou de l'incubation, les follicules ont été soumis à la technique du demi follicule telle que décrite par Martin (1986). Les follicules ont été alors congelés dans de l'azote liquide puis hemisectionnés, une moitié du follicule a été conservée à -70°C pour un dosage ultérieur des stéroïdes dans le liquide folliculaire. L'autre moitié a été immédiatement plongée dans une solution de fixation histologique (liqueur de Bouin) à 4°C pendant 24 heures et transférée par la suite dans de l'éthanol 70 % jusqu'au moment de l'application des techniques



histologiques classiques. À la fin de la technique d'histologie les coupes sériees (7  $\mu$ m d'épaisseur) ont été colorées à l'hématoxyline de Harris (BDH Chemicals), sans qu'il n'y ait de contre-coloration.

### **2.2.3 Critères de l'atrésie**

#### **2.2.3.1 Protocole expérimental**

Notre étude a été faite sur 160 follicules provenant de paires d'ovaires différentes récoltées à l'abattoir et disséquées à raison de 6 ou 7 follicules par paire d'ovaires en moyenne. Les follicules disséqués avaient un diamètre réparti entre 5 et 16 mm. Ils ont été soumis à la technique du demi follicule (Martin, 1986). À la suite des observations histologiques, nous avons établi une grille de critères pour la détermination de l'état du follicule (voir tableau 5); basée essentiellement sur le nombre de couches de cellules de la granulosa et le nombre de pycnoses par section folliculaire.

#### **2.2.3.2 Évaluation microscopique des différents états folliculaires**

Nous avons identifié quatre catégories d'états folliculaire. Les principaux critères de détermination de ces quatre types d'état sont résumés au tableau 5 et illustrés dans les figures 1, 2 et 3.

Un follicule normal (N) est un follicule qui a de 7 à 18 couches de cellules de la granulosa et au plus 5 pycnoses (cellule à noyau condensé qui ne présente ni cytoplasme ni membrane) par section folliculaire. La granulosa est bien organisée avec une limite antrale régulière. La membrane basale est toujours présente et continue. Les cellules basales de la granulosa sont souvent cylindriques.

Dans les follicules en début de l'atrésie (niveau A1), le nombre de couches de cellules de la granulosa est également de 7 à 18. Toutefois, nous avons compté de 10 à 25 pycnoses par section folliculaires. De plus, nous avons remarqué la présence de cellules qui ressemblent aux pycnoses lorsque ces dernières sont observées à un grossissement microscopique de 400  $\times$ . Cependant, lorsque nous observons ces mêmes cellules à un grossissement plus fort (2000  $\times$ ), nous voyons qu'elles présentent, de l'intérieur vers l'extérieur, un noyau rond très foncé, une couche de cytoplasme puis une membrane. Ces cellules ont donc un aspect différent de celui des pycnoses. Nous avons donc donné à ces structures le nom de prépycnoses. Ils sont au nombre de 25 à 30 par section folliculaire. Ainsi, si on compte le nombre de pycnoses et de prépycnoses, ce nombre est de 50 au maximum par section folliculaire. D'autre part, à ce niveau A<sub>1</sub> de l'atrésie, la granulosa est assez bien organisée avec une limite antrale plus ou moins régulière. La membrane basale est toujours présente mais souvent discontinue. Les cellules basales de la granulosa sont cylindriques par endroits.

Les follicules en atrésie avancée (niveau A2) ont 4 à 5 couches de cellules de la granulosa. Nous avons compté plus de 50 pycnoses par section folliculaire. Par contre, nous n'avons pas

observé de prépycnoses. Les cellules pycnotiques se retrouvent dans le liquide folliculaire. Les couches de cellules de la granulosa sont désordonnées. La membrane basale est habituellement absente.

Les follicules en atresie très avancée ont 1 à 3 couches de cellules de la granulosa. Les pycnoses sont nombreuses (beaucoup plus que 50 pycnoses par section folliculaire). La lame basale est absente. Les couches de cellules de la granulosa désordonnées forment un cordon cellulaire.

#### **2.2.4 Culture stationnaire**

Les follicules ont été incubés dans des contenants en verre dont le type et le diamètre sont fonction de la taille du follicule (Rouillier, 1991) afin qu'ils soient submergés par le milieu de culture d'à peine quelques millimètres pour faciliter les échanges gazeux, air-milieu-follicule. Le volume du milieu d'incubation est aussi en fonction de la surface du follicule selon l'équation :

$$V = (1,5 \times S \text{ mm}^2) / 78,5 \text{ mm}^2$$

(V = volume du milieu d'incubation, S = surface du follicule) (Rouillier, 1991).

Le milieu de culture était composé de M 199 (Gibco, Burlington, Ontario, Canada) additionné de 26 mM de  $\text{NaHCO}_3$  (Fisher, New-Jersey, USA) et 20 mM d'Hepes (Sigma, St-Louis, USA). À ce milieu de culture nous avons ajouté 0,1 % d'albumine sérique de boeuf (BSA) pour minimiser l'accrolement des stéroïdes aux parois des contenant utilisées dans les différentes manipulations, 100 UI d'antibiotique, le Penstrep utilisé aussi par Rouillier (1991) afin d'éviter la

contamination bactérienne et fongique dans le milieu de culture, et 0,001 pg / ml d'un facteur de croissance, l'insuline (insuline bovine, Sigma, St-Louis) pour mieux préserver l'intégrité du follicule pendant l'incubation (Monniaux, 1982; Zhang, et al., 1991). Les follicules ont été incubés dans un bain agitateur à faible vitesse à 37°C sous une atmosphère d'oxygène (95 %) et de CO<sub>2</sub> (5 %) (Rouillier, 1991). Nous avons fait des études pour déterminer les meilleures conditions d'incubation concernant la durée, la concentration de FSH porcine et celle d'androstènedione marquée au carbone 14 (précurseur de synthèse de testostérone, d'estradiol et d'estrone) supplémentant le milieu d'incubation. Celles-ci seront décrites en détail à la section suivante. À la suite de ces expériences, nous avons choisi les paramètres suivants: durée de culture: 4 heures; concentration de FSH: 2ng/ml; concentration d'androstènedione marquée au carbone 14:  $4,36 \times 10^{-7}$  M.

À la fin de l'incubation, le milieu de culture a été prélevé individuellement et congelé à -20°C afin de mesurer ultérieurement la concentration d'hormones stéroïdes totales relâchées au cours de l'incubation (RIA) et pour mesurer la quantité d'hormones nouvellement synthétisées présentes dans le milieu de culture. Les follicules ont été plongés dans l'azote liquide, puis hémisectionnés selon la technique du demi-follicule (Martin, 1986). Une partie du follicule a subi la technique d'histologie; l'autre partie a été conservée à -70°C pour un dosage ultérieur d'hormones stéroïdes dans le liquide folliculaire.

## **2.2.5 Mesure de la synthèse *de novo*: établissement des conditions adéquates de culture de follicule**

### **2.2.5.1 Protocole expérimental**

Nous avons incubé individuellement 75 follicules, dont 30 de petite taille (5 à 7,9 mm) et 45 de grande taille ( $\geq 8$  mm) dans un système de culture stationnaire. La durée de l'incubation a varié entre 4, 10, 12, 14, 18, et 24 heures afin de choisir une période qui soit suffisamment longue pour permettre au follicule de synthétiser des quantités détectables, tout en conservant son état fonctionnel. Nous avons utilisé trois concentrations de  $^{14}\text{C}$ -androstènedione: 2,18, 4,36 ou  $6,54 \times 10^{-7}$  M. Pour ce choix, nous nous sommes basé sur les données de Rouillier et al. (1995) en culture de cellules de la granulosa. Ce chercheur utilise le  $^{14}\text{C}$ -androstènedione à  $2,18 \times 10^{-7}$  M. Nous avons utilisé aussi 2 fois et 3 fois cette concentration étant donné que dans notre cas nous avons tout le follicule en culture et non les cellules de la granulosa. De plus, nous savons aussi que le  $K_m$  de l'enzyme  $P_{450}$  aromatasase est de l'ordre de  $1,2 \times 10^{-7}$  M (McNatty et al., 1984a). Pour la FSH, nous avons utilisé deux concentrations : 2 ng/ml et 10 ng/ml. Ce choix a été pris à la suite des résultats de Rouillier et al. (1995) obtenues avec les cultures de cellules de la granulosa. Selon ces résultats, la synthèse d'estradiol-17 $\beta$  est optimale à une concentration de FSH dans le milieu d'incubation à 2 ng/ml alors que les concentrations de 0 ng/ml et 10 ng/ml de cette hormone étaient défavorables à cette synthèse. D'autre part, nous avons observé dans d'autres études de culture de périfusion (voir chapitre 6: annexe), que les follicules traités à 10 ng/ml de FSH avaient une tendance à relâcher plus d'estradiol dans le milieu d'incubation que

ceux traités à 0 et 100 ng/ml. C'est pour cela que nous avons utilisé deux concentrations de FSH (2 ng/ml et 10 ng/ml) au lieu de trois concentrations (0 ng/ml, 2 ng/ml et 10 ng/ml) puisque les manipulations sont nombreuses et longues. Au terme de l'incubation, les hormones nouvellement synthétisées par le follicule ( $^{14}\text{C}$  testostérone,  $^{14}\text{C}$  estradiol-17 $\beta$  et  $^{14}\text{C}$  estrone) ont été quantifiées par comptage de la radioactivité dans le milieu d'incubation et le liquide folliculaire. Cette quantification a été possible après avoir réalisé sur le liquide folliculaire et le milieu de culture une extraction de ces hormones suivie par leur séparation à l'aide de chromatographies en couches minces telles que nous allons le décrire dans les sections 2.2.9 et 2.2.10. Les résultats sont exprimés en pg/follicule (c-à-d pg / volume total du milieu de culture ajouté à celui du liquide folliculaire) en tenant compte de l'activité spécifique des hormones marquées au carbone 14. Par la suite, les résultats obtenus, pour chaque hormone nouvellement synthétisée par le follicule, ont fait l'objet de tests statistiques par analyse de variance (logiciel S.A.S, 1989). Le test de Duncan a été utilisé pour comparer les groupes. Compte tenu du nombre limité de follicules utilisés pour cette étude, seuls les effets principaux de la durée d'incubation, de la quantité de  $^{14}\text{C}$ -androstènedione et de la quantité de FSH ont été analysés. Le dispositif expérimental ne permettait pas l'étude de l'interaction entre ces facteurs.

## **2.2.5.2 Résultats**

### **2.2.5.2.1 Durée de la culture**

La figure 4 illustre les résultats concernant les concentrations des stéroïdes nouvellement synthétisés par le follicule ( $^{14}\text{C}$  testostérone,  $^{14}\text{C}$  estradiol-17 $\beta$  et  $^{14}\text{C}$  estrone) selon la durée de la culture pour les deux classes folliculaires. Quelle que soit la taille du follicule, la durée de la culture n'a pas d'effet significatif sur la synthèse folliculaire de ces trois hormones. Les concentrations des stéroïdes nouvellement synthétisés par le follicule sont donc mesurables à une durée d'incubation de 4 heures. Nous avons donc choisi cette durée de culture pour nos essais ultérieurs, puisque nous savons qu'elle est favorable pour conserver l'état morphologique et physiologique du follicule. En effet les études antérieures dans notre laboratoire (Rouillier, 1991) et nos propres études (voir chapitre 6: annexe) en fournissent les preuves.

### **2.2.5.2.2 Précurseur $^{14}\text{C}$ androstènedione**

Dans la figure 5 nous remarquons que la synthèse de  $^{14}\text{C}$  testostérone, par les follicules de classe 1, est la même pour les trois groupes. Néanmoins, nous observons une synthèse de cette hormone par les gros follicules (classe 2), significativement plus importante lorsque le milieu de culture est enrichi de  $^{14}\text{C}$  androstènedione à  $4,36 \times 10^{-7} \text{ M}$  au lieu  $2,18 \times 10^{-7} \text{ M}$  ( $p = 0,02$ ). Par ailleurs, à partir de la même figure, nous ne décelons aucune différence significative entre les trois groupes de traitement du milieu au  $^{14}\text{C}$  androstènedione pour la synthèse de  $^{14}\text{C}$  estradiol-17 $\beta$  et

de  $^{14}\text{C}$  estrone. Ceci est observé pour les deux classes folliculaires. Nous choisissons alors la concentration de  $^{14}\text{C}$  androstènedione à  $4,36 \times 10^{-7} \text{ M}$  (soit environ 3,5 fois le  $K_m$  de l'enzyme  $P_{450}$  aromatasé) pour nos études ultérieures, parce que c'est la concentration qui nous a fourni une synthèse optimale de  $^{14}\text{C}$  testostérone pour les gros follicules.

#### **2.2.5.2.3 Concentration de FSH**

À partir de la figure 6, nous remarquons que la concentration de FSH à 2 ng/ml ajoutée dans le milieu d'incubation favorise significativement la synthèse de  $^{14}\text{C}$  testostérone ( $p = 0,03$ ) et du  $^{14}\text{C}$  estradiol-17 $\beta$  (classe1,  $p = 0,007$ ; classe2,  $p = 0,03$ ) , par comparaison à la concentration de FSH à 10 ng/ml, ceci étant vrai pour les deux classes folliculaires. Cependant, une plus grande concentration de FSH ne semble pas influencer la synthèse de  $^{14}\text{C}$  estrone et ce, aussi bien pour les moyens que pour les gros follicules. De ce fait nous allons utiliser la concentration de FSH à 2ng/ml pour nos études ultérieures.

#### **2.2.6 Technique d'extraction pour dosage RIA**

L'estradiol-17 $\beta$ , l'androstènedione et la progestérone ont été extraits du liquide folliculaire, selon la technique décrite par Rouillier (1991). Nous avons utilisé comme solvants un mélange d'éther de pétrole et d'éthyl acétate (11 : 2; vol/vol; Accusolv, Anaschemia, Montréal). Le pourcentage de récupération est de 90 % pour l'estradiol-17 $\beta$ ; 100 % pour l'androstènedione et 100 % pour la progestérone.



### **2.2.7 Dosage des hormones par radioimmunoétalonnage (RIA)**

Les concentrations d'estradiol du milieu de culture, d'estradiol, d'androstènedione et de progestérone du liquide folliculaire, ont été mesurées par radioimmunoétalonnage selon la technique décrite par Martin (1986) et Rouillier (1991). Nous avons utilisé des anticorps développés chez le lapin respectivement contre la progestérone-12 (O-carboxyméthyle)-oxyme-BSA, l'androstènedione-11- $\alpha$ -hemisuccinate-BSA et l'estradiol-7- $\alpha$ -butyrate-BSA (équipe du Dr. A. Bélanger, laboratoire d'endocrinologie moléculaire, Université Laval, Québec). Ces anticorps sont hautement spécifiques et permettent de réduire les réactions croisées avec les autres stéroïdes à moins de 1 % pour l'anti-estradiol et à moins de 3 % pour l'anti-androstènedione et l'anti-progestérone. Les coefficients de variation intra et interdosages sont de 5,6 % et 13,5 % pour l'estradiol, 7,6 % et 10,4 % pour l'androstènedione et 4,3 % et 15 % pour la progestérone.

### **2.2.8 Validation des dosages d'hormones stéroïdes (par RIA) sans extraction du liquide folliculaire**

Afin d'éviter la sous-estimation des mesures hormonales occasionnée par un dosage RIA du liquide folliculaire sans extraction de ce dernier, un essai préalable a été réalisé dans le but d'établir une correspondance des concentrations hormonales mesurées dans le liquide folliculaire avec ou sans extraction pour les trois hormones étudiés à savoir, estradiol-17 $\beta$ , androstènedione et progestérone. Ainsi un dosage RIA du liquide folliculaire a été effectué pour 60 follicules de différents diamètres (moyens et gros). Chacun de ces liquides folliculaires a été dosé deux fois en même temps et exactement dans les mêmes conditions, une fois après avoir subi la technique

d'extraction et une fois sans extraction. Ce dosage a été réalisé séparément pour les trois hormones stéroïdes étudiées. La concentration des échantillons de liquide folliculaire mesurés par RIA après extraction est corrigée selon le pourcentage de récupération obtenu lors de l'extraction (voir section 2.2.6).

Comme nous pouvons le constater dans la figure 7, la quantité d'hormones mesurée par RIA après extraction du liquide folliculaire varie de façon linéaire avec celle mesurée sans extraction de ce dernier. Ceci est observé pour les trois hormones étudiées à savoir, l'estradiol-17 $\beta$ , l'androstènedione et la progestérone. En effet, les résultats montrent une droite pour chaque hormone étudiée. Nous pouvons constater, de plus, que les coefficients de corrélation des trois droites sont très hauts (estradiol-17 $\beta$ :  $R = 0,994$ , androstènedione:  $R = 0,962$ , progestérone:  $R = 0,996$ ).

Nous remarquons que la valeur de l'hormone obtenue sans extraction du liquide folliculaire dans le cas de l'estradiol-17 $\beta$  est relativement plus faible que celle mesurée après extraction. Ceci est vrai quelle que soit l'ordre de valeur mesurée. Dans le cas de l'androstènedione, nous sous-estimons la mesure de cette hormone d'une valeur de 14410 pg / ml lorsque nous effectuons notre dosage sans extraire le liquide folliculaire et ceci est vrai, quel que soit l'ordre de valeur de l'hormone mesurée. Il s'ensuit que plus les valeurs mesurées sont faibles, plus le risque d'erreur est grand. Enfin, en ce qui concerne la progestérone, la valeur de l'hormones que nous mesurons sans extraction n'est pas différente de celle que nous obtenons après extraction du liquide folliculaire. Cette constatation est aussi bien valable pour les faibles que pour les grandes valeurs

mesurées dans le liquide folliculaire. Il n'est donc pas nécessaire, dans nos essais ultérieurs, d'extraire le liquide folliculaire pour mesurer la progestérone.

Étant donné que l'extraction des stéroïdes est une étape très onéreuse, les correspondances établies nous permettent donc de mesurer les hormones stéroïdes sans extraction et d'effectuer ensuite à l'aide des équations des droites, les corrections nécessaires pour établir la véritable concentration. Nous allons donc faire ces corrections dans le cas de l'estradiol-17 $\beta$  et de l'androstènedione.

### **2.2.9 Technique d'extraction pour chromatographie en couches minces**

Au terme de l'incubation, les liquides folliculaires (100  $\mu$ l) et les milieux de culture (1 ml) ont été supplémentés individuellement d'un mélange d'hormones stéroïdes (standards) : l'estradiol-17 $\beta$ , l'androstènedione, l'estrone et la testostérone (Sigma, St-Louis, MO) à une concentration de 10 nM. Ceci nous a permis de situer la migration de ces hormones lors de la chromatographie en couches minces (CCM) et ce, après révélation des plaques de CCM à l'aide de rayons ultraviolets et de l'iode solide. Nous avons procédé par la suite à une double extraction de ces liquides folliculaires et milieux de culture à l'aide de l'éther éthylique (ACP : E-120), (4 ml par tube). Lors de la première extraction, les tubes ont été vortexés légèrement puis déposés sous une hotte pour une durée de 2 heures pour que les deux phases se séparent. Suivant cette attente, on a congelé les tubes dans un bain de méthanol/neige carbonique. Ensuite l'extrait (dissous dans l'éther éthylique) a été décanté dans des tubes 12 x 75 mm puis évaporé sous vide. L'extrait sec obtenu

a subi de nouveau une deuxième extraction similaire à la première. A la fin de cette deuxième extraction, l'extrait a été resuspendu à l'aide de 50 ml de dichlorométhane (Fisher D<sub>37</sub> B-1) afin de subir une chromatographie en couches minces pour séparer les hormones stéroïdes (estradiol-17 $\beta$ , estrone, testostérone et androstènedione), selon la technique décrite dans la section suivante.

### **2.2.10 Chromatographie en couches minces**

Les hormones stéroïdes du liquide folliculaire et du milieu de culture dissous dans le dichlorométhane ont été vortexés quelques secondes, puis appliqués sur une plaque de CCM (gel de silice : 20 x 15 cm) à raison de 10  $\mu$ l à l'aide d'un capillaire. La migration des hormones stéroïdes a été réalisée dans un mélange de solvant toluène-acétone-acide acétique(4 : 1 : 0,05). Les stéroïdes ont été détectés à l'aide des rayons ultra-violet (pour l'androstènedione et la testostérone) et de l'iode solide (pour l'estradiol et l'estrone). Les tâches ont été déposées dans 4 ml de cocktail à scintillation (Ready-solv Beckman, Toronto, Can).

### **2.2.11 Mesure de l'épaisseur de la thèque interne et de la granulosa selon l'état du follicule**

Dans le but d'étudier la relation de l'épaisseur de la thèque interne et de celle de la granulosa avec l'état du follicule, nous avons utilisé 79 follicules (38 de moyenne taille et 41 de grande taille). Les follicules ont subi la technique du demi follicule (Martin, 1986), puis nous avons réalisé l'histologie classique sur une hémisection. À la suite de l'histologie nous avons

mesuré l'épaisseur de la thèque interne et celle de la granulosa au microscope. Pour ce faire, nous avons utilisé un oculaire gradué en unités et une lame graduée en millimètres et nous avons calculé pour chaque unité de l'oculaire la valeur en millimètres. Ceci nous a permis par la suite de calculer l'épaisseur des couches en comptant le nombre d'unités sur l'oculaire gradué.

La variation de l'épaisseur de la thèque interne en fonction de l'état du follicule a été comparée par contrastes orthogonaux. Le modèle statistique utilisé incluait les sources de variations reliées à l'état folliculaire (c'est à dire normal, N; début de l'atrésie, A<sub>1</sub>; atrésie avancée, A<sub>2</sub>; atrésie très avancée, A<sub>3</sub>). Nous avons comparé dans un premier temps les groupes N+A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>+A<sub>3</sub> parce que ces deux groupes seraient théoriquement différents sur le plan physiologique. Ensuite nous cherchons à détecter s'il existe une différence entre les follicules normaux et ceux qui débudent l'atrésie puis entre les groupes A<sub>2</sub> et A<sub>3</sub>. L'analyse a été faite séparément pour les deux classes folliculaires parce que ces dernières n'ont pas le même patron de relâche des stéroïdes *in vitro* (Kruip et Dieleman, 1989).

### **2.2.12 Mesure du contenu du liquide folliculaire en stéroïdes selon l'état du follicule**

Dans le but de voir l'effet de l'état du follicule sur le contenu du liquide folliculaire en stéroïdes, l'étude a été faite sur 106 follicules (48 de moyenne taille et 58 de grande taille) dont la plupart ont servi pour la mesure de la thèque interne (section 2.2.11). Ces derniers ont subi la technique du demi follicule (Martin, 1986), une moitié a servi pour l'histologie classique, l'autre pour le dosage (par RIA) des hormones stéroïdes: l'estradiol-17 $\beta$ , l'androsténédione et la

progestérone du liquide folliculaire. Les résultats obtenus concernant la concentration de ces hormones ainsi que leurs rapports molaires  $E_2/A$  et  $E_2/P_4$  ont fait l'objet d'une analyse statistique par contrastes orthogonaux. Cette analyse tenait compte, pour chaque classe folliculaire, de l'état du follicule de la même façon que nous l'avons décrit dans le premier protocole expérimental.

La répartition des follicules selon l'état histologique et l'activité estrogène  $E_2/A$  d'une part et  $E_2/P_4$  d'autre part a fait l'objet de la dernière étape de la présente étude. L'analyse statistique dans ce cas était faite par un test d'analyse de proportions (test de chicarré) pour les deux classes folliculaires séparément.

### **2.2.13 Synthèse *in vitro* des stéroïdes selon l'état du follicule**

L'étude que nous entamons maintenant concerne les nouvelles synthèses des hormones stéroïdes par le follicule *in vitro* ainsi que le contenu d'estradiol-17 $\beta$  total (nouvellement synthétisé et préexistant) du liquide folliculaire et sa relâche dans le milieu d'incubation. Tous ces paramètres ont été étudiés en fonction de l'état du follicule pour les deux classes folliculaires.

Nous avons mis individuellement en culture 176 follicules dont 128 de taille moyenne et 48 de grande taille. Les conditions adoptées pour l'incubation ont été basées sur les résultats obtenus à la section 2.2.5. Au terme de la culture, les follicules ont été congelés et coupés en deux pour servir d'une part à l'histologie et d'autre part aux dosages des hormones ( $^{14}C$  testostérone,  $^{14}C$  estradiol-17 $\beta$  et  $^{14}C$  estrone nouvellement synthétisées par le follicule après chromatographie en

couches minces et l'estradiol-17 $\beta$  total par RIA) dans le liquide folliculaire. Le milieu de culture a été aussi récolté pour ces mêmes dosages. Dans le cas de l'estradiol-17 $\beta$  total du liquide folliculaire (dosé par RIA), nous avons dû le faire avec les échantillons de liquide folliculaire qui nous restaient après avoir effectué les autres dosages sur ces mêmes échantillons. C'est pour cela que dans nos résultats (figures 11 et 12) l'effectif des follicules des différents groupes comparés est différent entre ces deux figures d'une part et entre les résultats concernant le liquide folliculaire et le milieu de culture de la figure 12 d'autre part. Les techniques des dosages utilisés ont été décrites antérieurement (sections 2.2.6, 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9 et 2.2.10).

Pour les deux classes folliculaires, la variation des hormones en fonction de l'état du follicule a fait l'objet d'une analyse statistique par contrastes orthogonaux tel que décrit dans la section 2.2.11.

#### **2.2.14 Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel S.A.S (Statistical analysis system, 1989), (sections 2.2.11, 2.2.12 et 2.2.13). Pour normaliser la distribution toutes les données ont été transformées en valeurs logarithmiques avant d'être soumises à l'analyse statistique. Les résultats présentés ont été retransformés en valeurs réelles de façon à pouvoir les visualiser plus facilement.

Tableau 5 Les principaux critères histologiques des différents états folliculaires.

Etat du follicule	Nombre de couches de cellules de la granulosa	Nombre de pycnoses par section du follicule
Normal (N)	7 à 18	$\leq 5$
Début de l'atrésie (A <sub>1</sub> )	7 à 18	-10 à 25 -présence de cellules ressemblant aux pycnoses à 400× mais leur sont différentes à 2000×: 25 à 30 = prépycnoses
Atrésie avancée (A <sub>2</sub> )	4 à 5	> 50
Atrésie très avancée (A <sub>3</sub> )	1 à 3	>>> 50



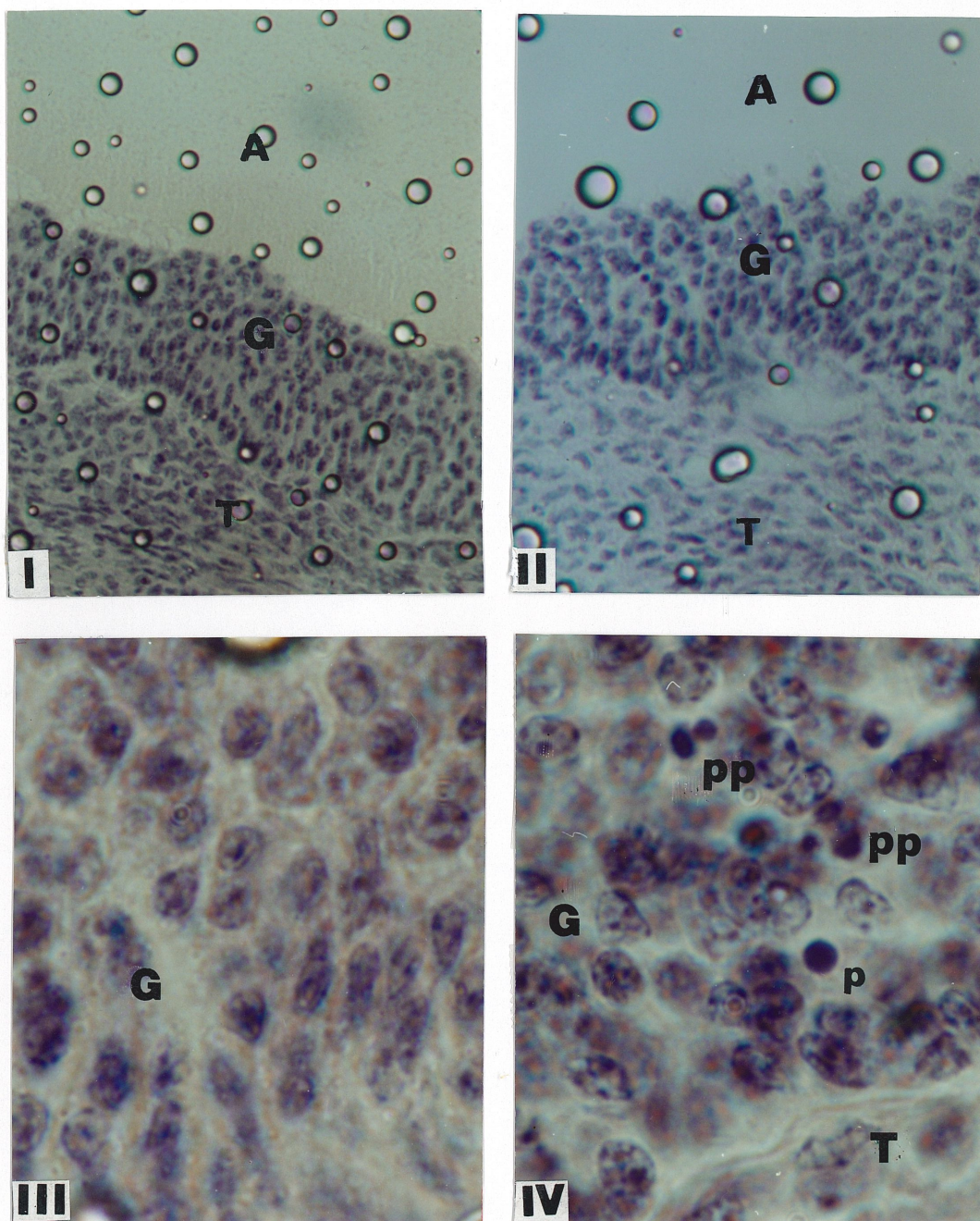


Figure 1      Coupes transversales de follicules normaux: N (I et III) et en début de l'atrésie: A<sub>1</sub> (II et IV). Photos I et II (346×). Photos III et IV (1690×).  
A = Antre,    G = Granulosa.,    T = Thèque interne,    P = Pycnose,    PP = Prépycnose.



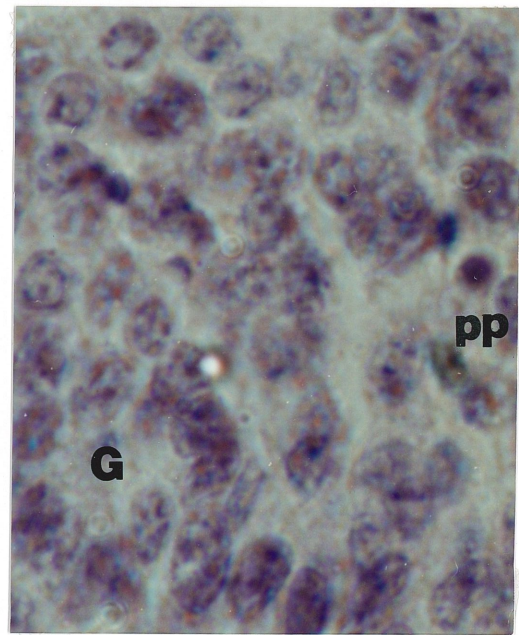
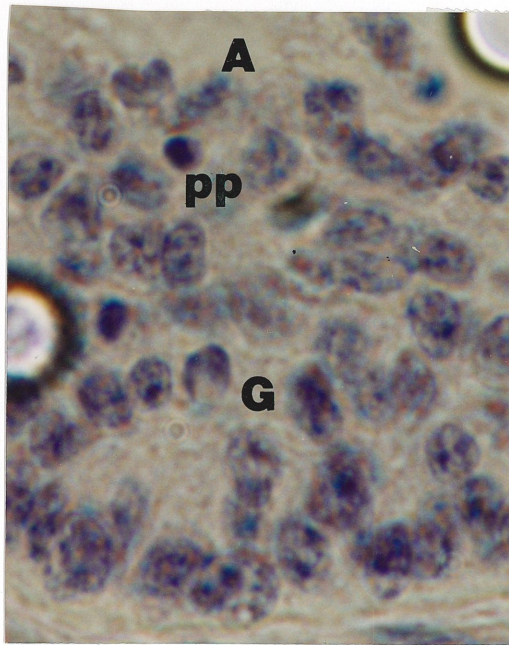
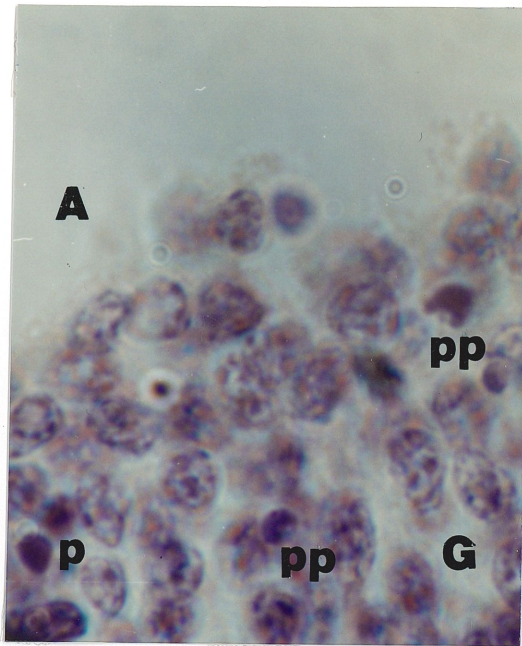


Figure 2 Coupes transversales de follicules en début de l'atrésie: A<sub>1</sub> (1690×).  
A = Antre, G = Granulosa, P = Pynose, PP = Prépynose.

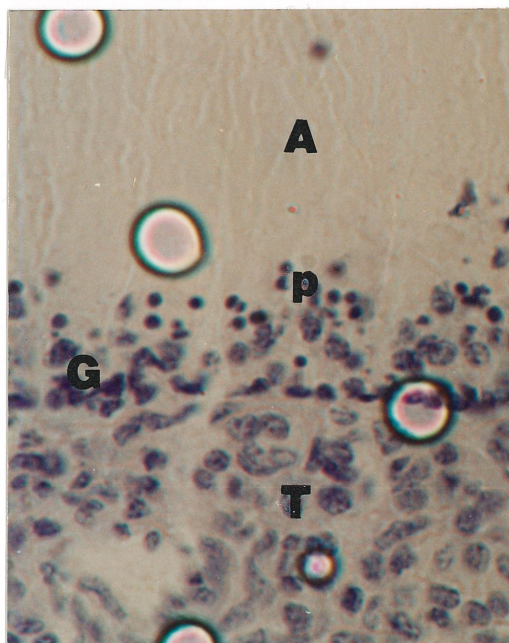
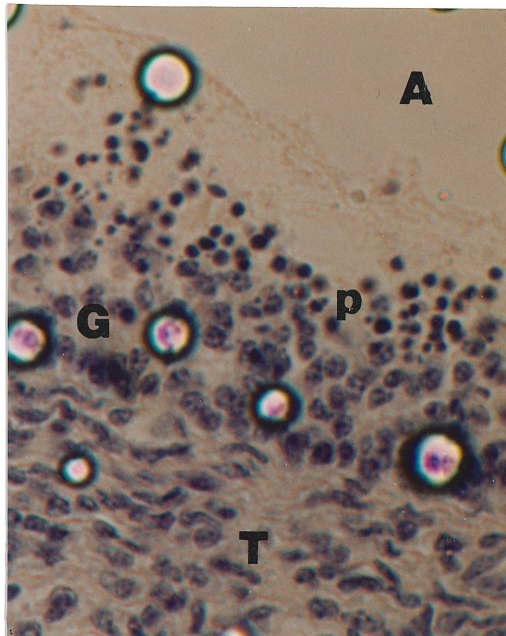
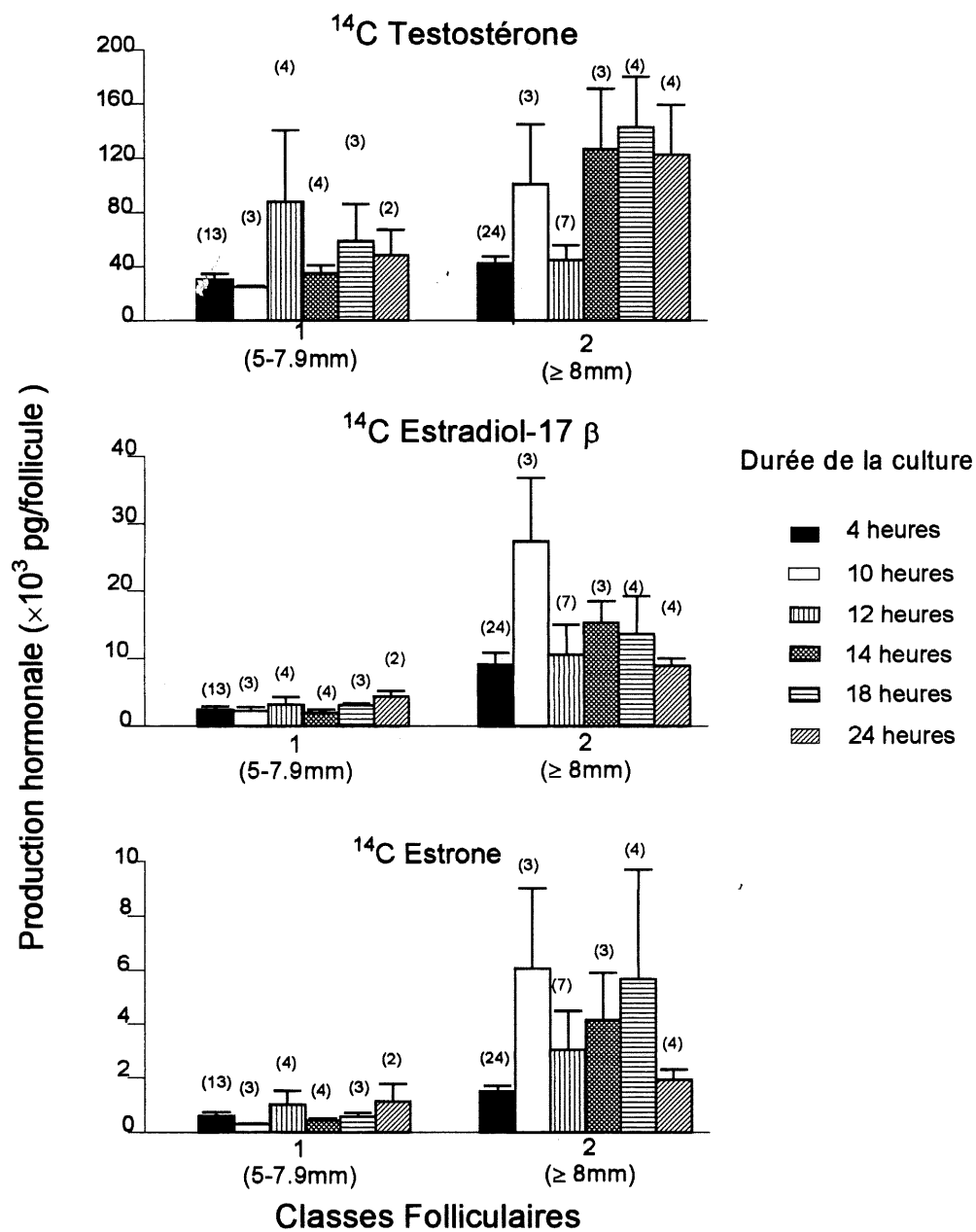


Figure 3

Coupes transversales de follicules en atrésie avancées: A<sub>2</sub> (photo du haut) et en atrésie très avancées: A<sub>3</sub> (photo du bas) (676×). A = Antre, G = Granulosa., T = Thèque interne, P = Pycnose.



**Figure 4** Effet de la durée de la culture sur la production des stéroïdes mesurée dans le volume total du milieu de culture et du liquide folliculaire pour les deux classes folliculaires.

( ) Nombre de follicules.

Chaque colonne indique la moyenne plus ou moins l'erreur standard moyenne.

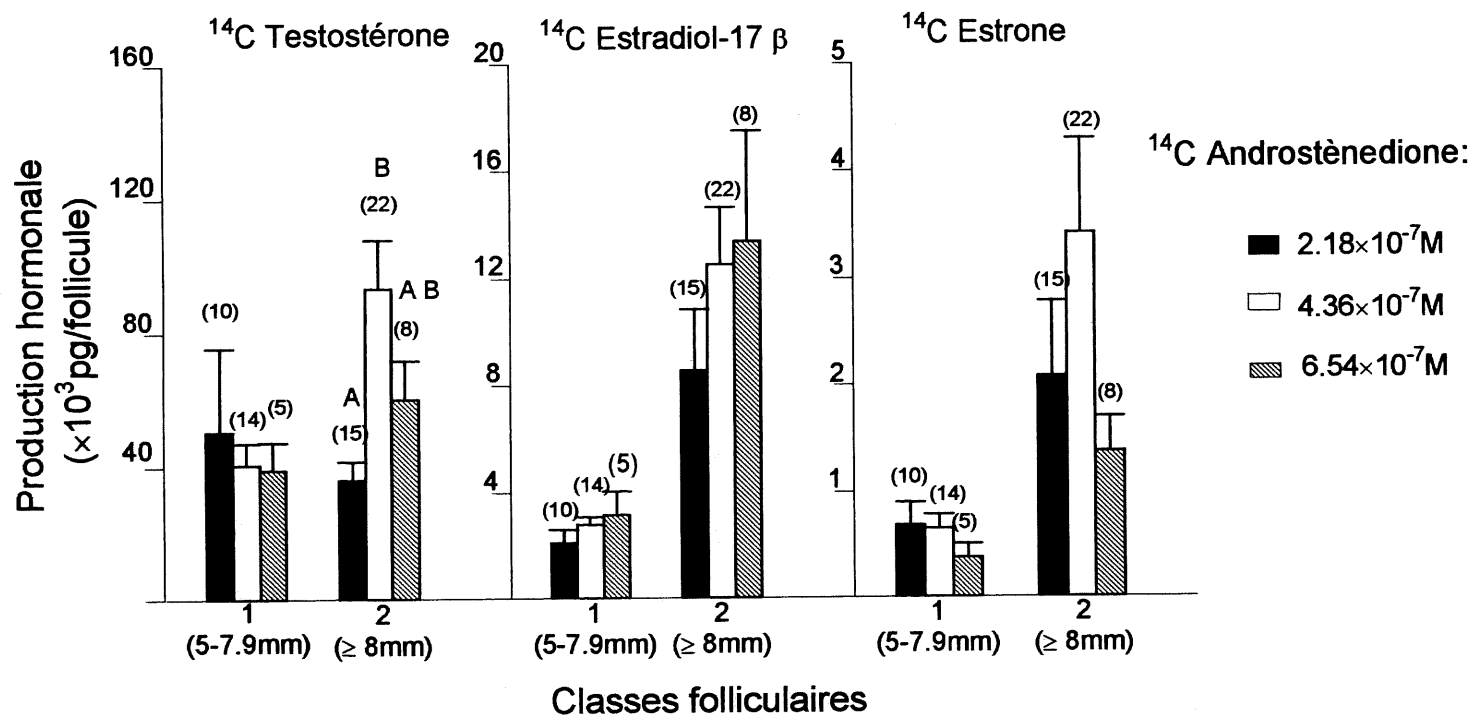


Figure 5 Effet de <sup>14</sup>C androstènedione sur la production des stéroïdes mesurée dans le volume total du liquide folliculaire et du milieu de culture pour les deux classes folliculaires.

( ) Nombre de follicules.

Des lettres différentes indiquent une différence significative,  $p = 0,02$ .

Chaque colonne indique la moyenne plus ou moins l'erreur standard moyenne.

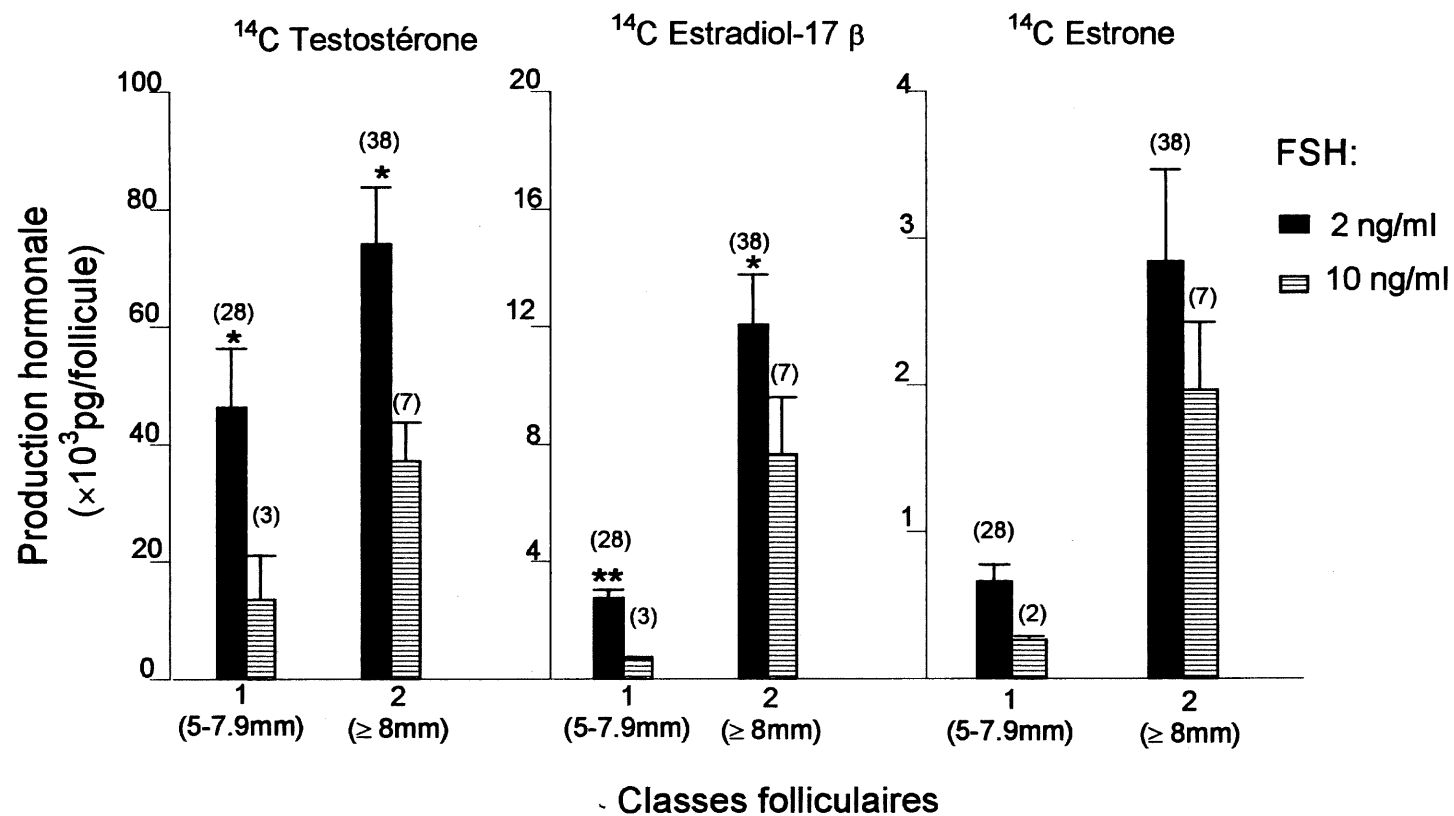


Figure 6 Effet de la FSH sur la production des stéroïdes mesurée dans le volume total du liquide folliculaire et du milieu de culture pour les deux classes folliculaires.

( ) Nombre de follicules.

Probabilité significative: \*,  $p = 0,03$ ; \*\*,  $p = 0,007$ .

Chaque colonne indique la moyenne plus ou moins l'erreur standard moyenne.

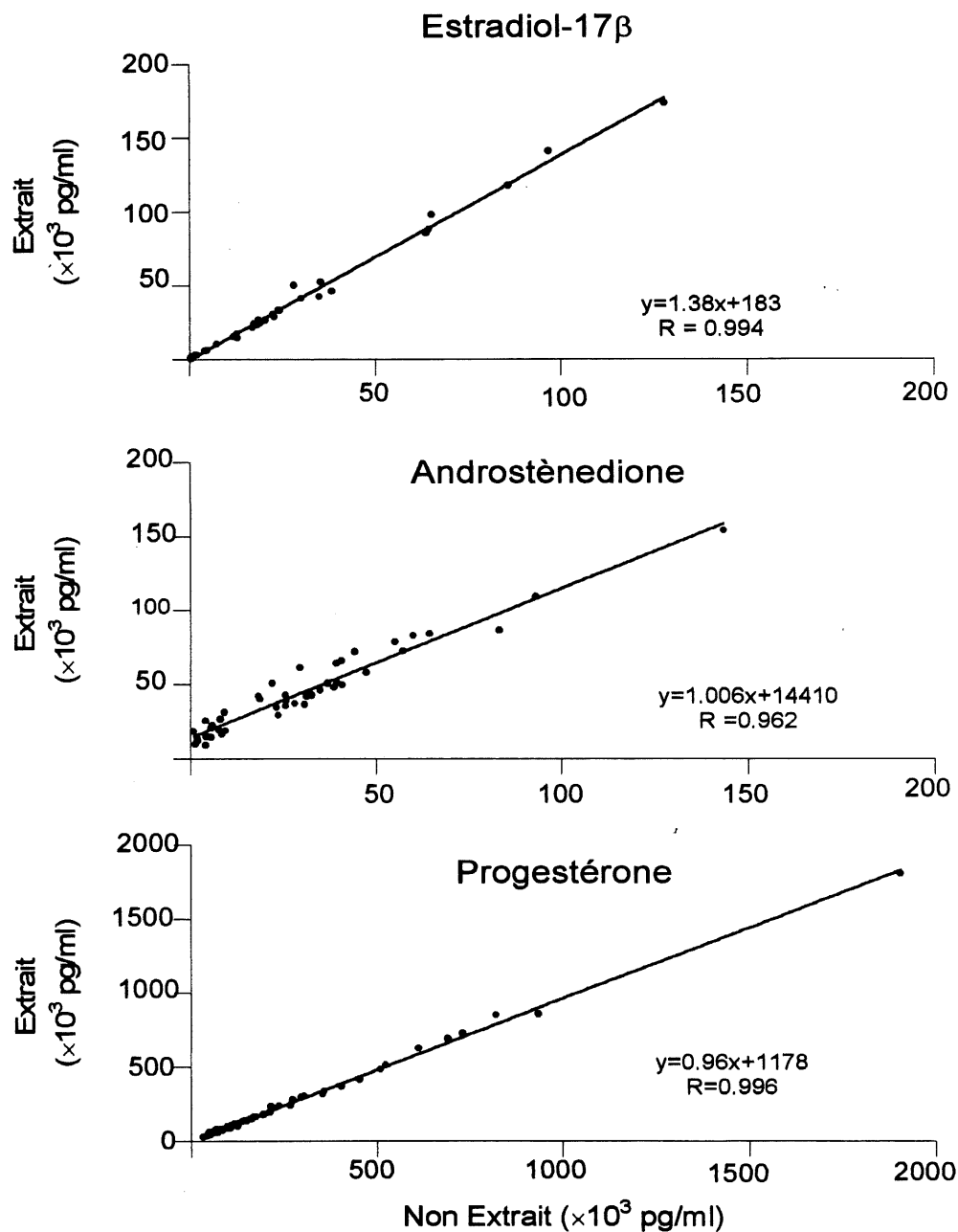


Figure 7 Comparaison des concentrations hormonales mesurées dans le liquide folliculaire après ou sans extraction.

R = Coefficient de corrélation.

## **2.3 Résultats**

### **2.3.1 Effet de l'état du follicule sur l'épaisseur de la thèque interne et de la granulosa**

L'épaisseur de la thèque interne ne change pas avec l'état folliculaire aussi bien chez les moyens (classe 1) que chez les gros follicules (classe 2) et ce même en atresie avancée (figure 8 et tableau 6). En ce qui concerne la granulosa, nous avons discriminé les différents états folliculaires en utilisant entre autres le nombre de ses couches. Selon notre hypothèse, les follicules normaux et ceux qui sont en début de l'atresie présentent le même nombre de couches de la granulosa. Ce nombre diminue chez les follicules en atresie avancée et très avancée. Nous avons voulu simplement vérifier si l'épaisseur de la granulosa varie avec le début de l'atresie. Nos résultats montrent une diminution significative (voir tableau 6 pour les probabilités) de l'épaisseur de la granulosa avec l'atresie avancée du follicule et ce, chez les 2 classes folliculaires. Cette diminution n'est pas observée avec le début de l'atresie comparé à l'état normal du follicule (voir figure 8 et tableau 6).



## **2.3.2 Effets de l'état du follicule sur le contenu du liquide folliculaire en stéroïdes**

### **2.3.2.1 Estradiol-17 $\beta$**

La concentration du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  diminue en atresie avancée (A2) et très avancée (A3) par rapport à celui mesuré chez les follicules normaux et en début de l'atresie, ceci étant vrai pour les deux classes de tailles folliculaires (classe 1,  $p = 0,0008$ ; classe 2,  $p = 0,0003$ ). Cette diminution n'est cependant pas significative avec le début de l'atresie folliculaire par comparaison à l'état normal du follicule et ce, quelle que soit la taille du follicule étudié (voir figure 9 et voir tableau 7)

### **2.3.2.2 Androstènedione**

Nous pouvons voir à la figure 9 et au tableau 7 que, chez les deux classes folliculaires, les follicules normaux ne diffèrent pas des follicules atresiques quant à leur contenu en androstènedione du liquide folliculaire. Il en est de même pour les moyens follicules en atresie avancée (A2) versus très avancé (A3). Cependant, chez les follicules de grande taille, nous remarquons une baisse significative de cette hormone dans le liquide folliculaire en atresie très avancée (A3) par comparaison à l'atresie avancée (A2), ( $p = 0,03$ ).

### **2.3.2.3 Progestérone**

Comme on peut le constater dans la figure 9 et le tableau 7, nous retrouvons le même patron de différences entre les groupes d'états folliculaires que celui décrit dans le cas de l'androstènedione du liquide folliculaire. Ceci est observé quelle que soit la taille du follicule. Toutefois, à l'inverse de la diminution observée précédemment dans le cas de l'androstènedione du liquide folliculaire lors de l'atrésie avancée versus très avancée, la progestérone subit plutôt une augmentation significative ( $p = 0,01$ ).

### **2.3.3 Effets de l'état du follicule sur les Rapports molaires E2/A et E2/P4**

Les follicules de moyenne taille (classe 1) présentent des rapports molaires de concentration d'estradiol-17 $\beta$  sur androstènedione et d'estradiol-17 $\beta$  sur progestérone, inférieurs à 1 (figure 10 et tableau 7.). Ces rapports molaires sont réduits de façon significative en atrésie avancée (A2) ou très avancée (A3) (E2/A,  $p = 0,01$ ; E2/P4,  $p = 0,0009$ ). Ceci n'est pas le cas lors du début de l'atrésie. Par ailleurs, ces deux rapports molaires sont supérieurs à 1 chez les follicules normaux de grande taille (classe 2). De plus, au sein de cette même classe de taille de follicules, les deux rapports molaires diminuent de façon significative dès le début de l'atrésie (E2/A,  $p = 0,0001$ ; E2/P4,  $p = 0,007$ , voir figure 10 et tableau 7)

### **2.3.4 Répartition des follicules estrogènes actifs selon leurs états**

Comme l'avait fait Martin (1986), il pourrait être intéressant de définir le follicule par son activité estrogène. Un follicule dont le rapport molaire  $E_2/A$  est supérieur à 1 serait alors estrogène actif, tandis que celui qui a un rapport  $E_2/A$  inférieur à 1 serait estrogène inactif. Il en est de même pour le rapport molaire  $E_2/P_4$ .

#### **2.3.4.1 Activité estrogène définie par le rapport molaire $E_2/A$**

Nous pouvons observer à partir du tableau 8, que la proportion des follicules estrogènes actifs de classe 1 ne diffère pas en fonction du niveau de l'atrésie ( $p = 0,05$ ). Mais lorsqu'on examine les résultats obtenus pour les follicules de classe 2, la proportion des follicules estrogènes actifs diffère en fonction du niveau de l'atrésie ( $p = 0,0001$ ). Ainsi 75% des gros follicules estrogènes actifs sont classés non atrésiques, tandis que, 14% seulement et 5% de ces follicules sont classés en début de l'atrésie et en atrésie avancée ou très avancée respectivement selon nos critères microscopiques. Nous remarquons alors avec notre nouvelle identification des différents états folliculaires que, parmi les follicules de grandes tailles, la proportion des follicules estrogènes actifs subit une chute brutale dès le début de l'atrésie.

#### **2.3.4.2 Activité estrogène définie par le rapport molaire $E_2/P_4$**

Nous pouvons observer à partir du tableau 9 que la proportion des follicules estrogènes actifs de classe 1 et de classe 2 respectivement ne diffère pas significativement en fonction du

niveau de l'atrésie (classe1,  $p = 0,08$ ; classe2,  $p = 0,05$ ). Il est à noter qu'il existe chez les follicules de grande taille une faible proportion des follicules estrogènes actifs ( $E_2/P_4 > 1$ ) (25%) au sein des follicules histologiquement non atrésiques selon nos critères microscopiques (tableau 9). Cependant lorsqu'on abaisse la norme arbitraire qui définit l'activité estrogène des gros follicules par le rapport molaire  $E_2/P_4 > 1$  de la valeur 1 à 0,1 (tableau 10), nous trouvons que l'activité estrogène est affectée par l'atrésie dès son début ( $p = 0,025$ ). En effet, la proportion des gros follicules dont le rapport molaire  $E_2/P_4$  est supérieur à 0,1 diminue de moitié dès le début de l'atrésie (tableau 10).

### **2.3.5 Effet de l'état du follicule sur la synthèse des stéroïdes**

#### **2.3.5.1 $^{14}\text{C}$ testostérone**

Nous remarquons à la figure 11 et au tableau 11 que les follicules atrésiques synthétisent moins de  $^{14}\text{C}$  testostérone que les follicules normaux (classe 1 et classe 2,  $p = 0,0001$ ). Nous observons également, une baisse de synthèse de cette hormone chez les follicules en atrésie très avancée (A3) par comparaison aux follicules en atrésie avancée (A2) (classe 1,  $p = 0,007$ ; classe 2,  $p = 0,0009$ ). De plus les follicules de grande taille en début de l'atrésie synthétisent moins de testostérone (classe 2,  $p = 0,04$ ) que les follicules normaux. Ceci n'est pas observé pour les follicules de moyenne taille.

### **2.3.5.2 $^{14}\text{C}$ estradiol-17 $\beta$ et $^{14}\text{C}$ estrone**

Nous trouvons que les follicules de classe 1 et de classe 2 synthétisent la même quantité de  $^{14}\text{C}$  estrone, quelle que soit leur état histologique. Il en est de même pour la synthèse de  $^{14}\text{C}$  estradiol-17 $\beta$  dans le cas des follicules de classe 1. Mais, chez les gros follicules, nous observons une baisse significative de synthèse folliculaire de cette hormone lors de l'atrésie avancée (A2) ou très avancée (A3) par comparaison aux follicules normaux ou débutant l'atrésie ( $p = 0,02$ ) (tableau 11 et figure 11).

### **2.3.6 Effet de l'état du follicule sur le contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$ total après culture des follicules**

Comme nous pouvons le constater à partir de la figure 12 et du tableau 11, le liquide folliculaire est moins riche en estradiol-17 $\beta$  total (nouvellement synthétisé et préexistant) chez les follicules (de classe 1 et de classe 2) en atrésie avancée (A2) ou très avancée (A3) par rapport aux follicules normaux (classe 1 et classe 2,  $p = 0,0001$ ) Cependant, cette différence n'est observée avec le début de l'atrésie que chez les moyens follicules (classe 1) ( $p = 0,0002$ , voir figure 12 et tableau 11).

### **2.3.7 Effet de l'état du follicule sur la relâche d'estradiol-17 $\beta$ total dans le milieu d'incubation**

Les follicules en atrésie avancée (A2) ou très avancée (A3) relâchent moins d'estradiol-17 $\beta$  total dans le milieu de culture que les follicules normaux. Ce résultat est observé pour les deux

classes de tailles folliculaires (classe 1 et classe 2,  $p = 0,0001$ ). De plus, les résultats montrent une baisse draconienne de relâche d'estradiol- $17\beta$  dans le milieu de culture, associé avec le début de l'atrésie (classe 1,  $p = 0,0003$ ; classe 2,  $p = 0,0001$ ). Cette baisse est de l'ordre de 50 % chez les moyens follicules (classe 1) et de 90% chez les gros follicules (classe 2) (voir figure 12 et tableau 11.)

Tableau 6 Niveau de probabilité associé aux effets de l'état du follicule sur l'épaisseur de la thèque interne et de la granulosa, pour les deux classes folliculaires.

Paramètres	Classe 1 (5 - 7,9 mm) <sup>1</sup> (38)			Classe 2 ( $\geq 8$ mm) <sup>1</sup> (41)		
	(N+ A <sub>1</sub> ) vs (A <sub>2</sub> + A <sub>3</sub> )	N vs A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> vs A <sub>3</sub>	(N+ A <sub>1</sub> ) vs (A <sub>2</sub> + A <sub>3</sub> )	N vs A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> vs A <sub>3</sub>
Thèque interne (mm)	0,44	0,37	0,29	0,10	0,38	0,94
Granulosa (mm)	0,0001 *	0,16	0,0004 *	0,0001 *	0,51	0,0001 *

N = Normal

A<sub>1</sub> = Début d'atrésie

A<sub>2</sub> = Atrésie avancée

A<sub>3</sub> = Atrésie très avancée

( ) Nombre de follicules

<sup>1</sup> = Analyse statistique par contrastes orthogonaux à l'intérieur de la classe

\* = Probabilité significative

Tableau 7 Niveau de probabilité associé aux effets de l'état du follicule sur la concentration et les rapports molaire des hormones stéroïdes du liquide folliculaire pour les deux classes folliculaires.

	Classe 1 (5 - 7,9 mm) <sup>1</sup> (37)			Classe 2 (≥ 8 mm) <sup>1</sup> (47)		
	(N+ A <sub>1</sub> ) vs (A <sub>2</sub> + A <sub>3</sub> )	N vs A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> vs A <sub>3</sub>	(N+ A <sub>1</sub> ) vs (A <sub>2</sub> + A <sub>3</sub> )	N vs A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> vs A <sub>3</sub>
E <sub>2</sub> (pg / ml)	0,0008 *	0,65	0,56	0,0003 *	0,06	0,67
A (pg / ml)	0,84	0,90	0,50	0,88	0,08	0,03 *
P <sub>4</sub> (pg / ml)	0,38	0,21	0,97	0,29	0,22	0,01 *
E <sub>2</sub> /A	0,01 *	0,67	0,97	0,0001 *	0,0001*	0,44
E <sub>2</sub> /P <sub>4</sub>	0,0009 *	0,98	0,65	0,0004 *	0,007 *	0,29

N = Normal

A<sub>1</sub> = Début de l'atrésie

A<sub>2</sub> = Atrésie avancée

A<sub>3</sub> = Atrésie très avancée

( ) Nombre de follicules

<sup>1</sup> Analyse statistique par contrastes orthogonaux à l'intérieur de la classe

\* = Probabilité significative

E<sub>2</sub> = Estradiol-17 β

A = Androstènedione

P<sub>4</sub> = Progestérone



Tableau 8 Répartition des follicules estrogènes actifs et inactifs par le rapport molaire  $E_2/A$  en fonction de l'état du follicule.

Classe	Etat du follicule	Activité estrogène	
		$E_2/A < 1,0$	$E_2/A > 1,0$
Classe 1	Normal	10 (91 %)	1 (9 %)
	Début de l'atrésie ( $A_1$ )	6 (86 %)	1 (14 %)
	Atrésie avancée ( $A_2$ ou $A_3$ )	19 (100 %)	0 (0 %)
Classe 2	Normal	3 (25 %)	9 (75 %)
	Début de l'atrésie ( $A_1$ )	12 (86 %)	2 (14 %)
	Atrésie avancée ( $A_2$ ou $A_3$ )	18 (95 %)	1 (5 %)

Classe 1,  $p = 0,05$

Classe 2,  $p = 0,0001$

Tableau 9 Répartition des follicules estrogènes actifs et inactifs par le rapport molaire  $E_2/P_4$  en fonction de l'état du follicule.

Classe	Etat du follicule	Activité estrogène	
		$E_2/P_4 < 1,0$	$E_2/P_4 > 1,0$
Classe 1	Normal	9 (82 %)	2 (18 %)
	Début de l'atrésie ( $A_1$ )	7 (100 %)	0 (0 %)
	Atrésie avancée ( $A_2$ ou $A_3$ )	19 (100 %)	0 (0 %)
Classe 2	Normal	9 (75 %)	3 (25 %)
	Début de l'atrésie ( $A_1$ )	12 (86 %)	2 (14 %)
	Atrésie avancée ( $A_2$ ou $A_3$ )	19 (100 %)	0 (0 %)

Classe 1,  $p = 0,08$

Classe 2,  $p = 0,05$

Tableau 10 Répartition des follicules de classe 2 en fonction du rapport molaire  $E_2/P_4$  ( $< 0,1$  ou  $> 0,1$ ) et de l'état du follicule.

Etat du follicule	$E_2/P_4 < 0,1$	$E_2/P_4 > 0,1$
Normal	3 (27 %)	8 (73 %)
Début de l'atrésie ( $A_1$ )	9 (64 %)	5 (36 %)
Atrésie avancée ( $A_2$ ou $A_3$ )	14 (74 %)	5 (26 %)

$p = 0,025$

Tableau 11 Niveau de probabilité associé aux effets de l'état folliculaire sur la synthèse hormonale du follicule (liquide folliculaire plus milieu de culture), sur la concentration du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  total et sa relâche *in vitro* pour les deux classes folliculaires.

	Classe 1 (5 - 7,9 mm) <sup>1</sup>			Classe 2 ( $\geq 8$ mm) <sup>1</sup>		
	(N+ A <sub>1</sub> ) vs (A <sub>2</sub> + A <sub>3</sub> )	N vs A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> vs A <sub>3</sub>	(N+ A <sub>1</sub> ) vs (A <sub>2</sub> + A <sub>3</sub> )	N vs A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> vs A <sub>3</sub>
<sup>14</sup> C T (pg / follicule)	0,0001 *	0,19	0,007 *	0,0001 *	0,04 *	0,0009 *
<sup>14</sup> C E <sub>2</sub> (pg / follicule)	0,69	0,37	0,44	0,02 *	0,44	0,76
<sup>14</sup> C E <sub>1</sub> (pg / follicule)	0,09	0,77	0,84	0,31	0,93	0,94
E <sub>2</sub> total : E <sub>2</sub> + <sup>14</sup> C E <sub>2</sub> (L. folliculaire) (pg / ml)	0,0001 *	0,0002 *	0,99	0,0001 *	0,64	0,12
E <sub>2</sub> total : E <sub>2</sub> + <sup>14</sup> C E <sub>2</sub> (M. de culture) (pg / ml / 4h)	0,0001 *	0,0003 *	0,10	0,0001 *	0,0001 *	0,30

N = Normal

A<sub>1</sub> = Début de l'atrésie

A<sub>2</sub> = Atrésie avancée

A<sub>3</sub> = Atrésie très avancée

<sup>1</sup> Analyse statistique par contrastes orthogonaux à l'intérieur de la classe

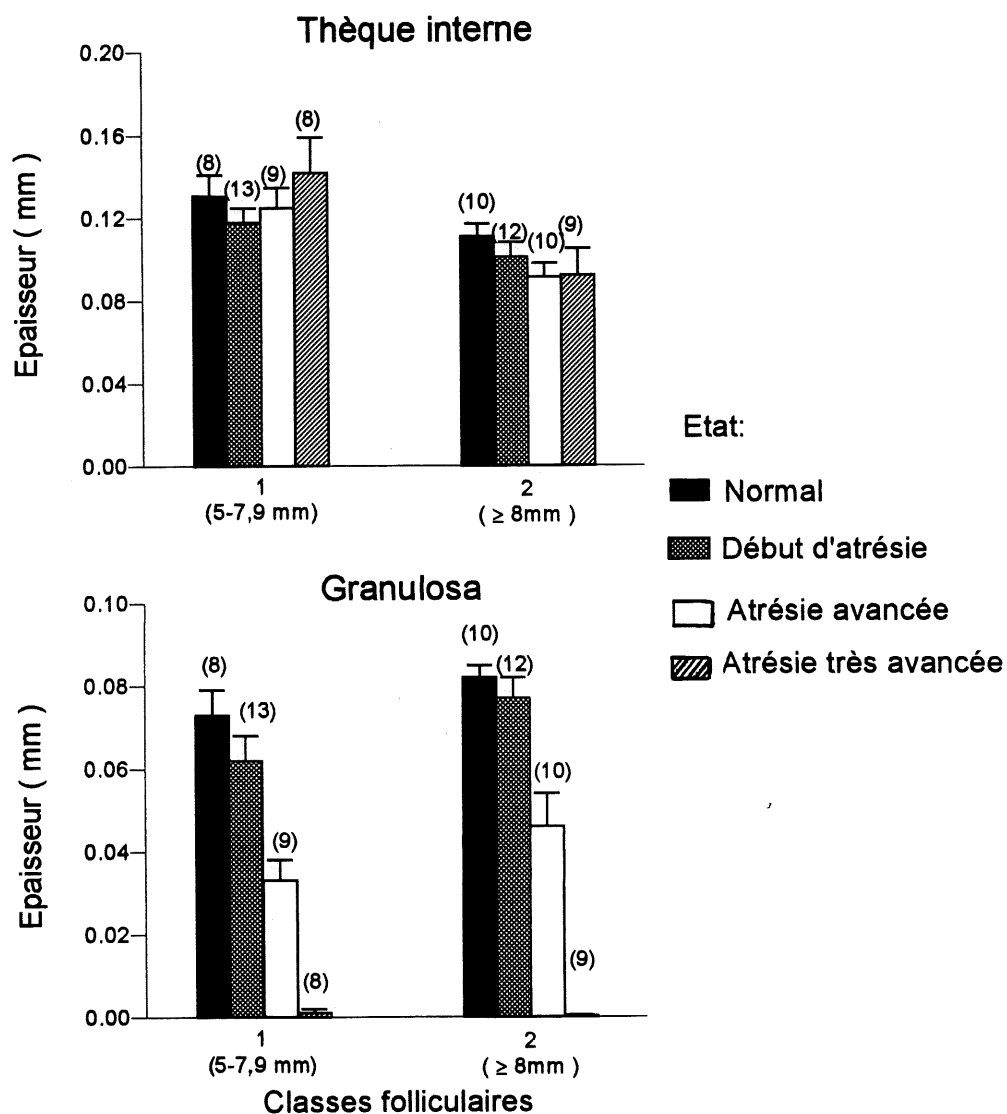
\* = Probabilité significative

T = Testostérone

E<sub>2</sub> = Estradiol-17  $\beta$

E<sub>1</sub> = Estrone

A = Androstènedione



**Figure 8** Epaisseur de la thèque interne et de la granulosa en fonction de l'état du follicule pour les deux classes folliculaires.

( ) Nombre de follicules.

Les analyses statistiques sont présentées au tableau 6.

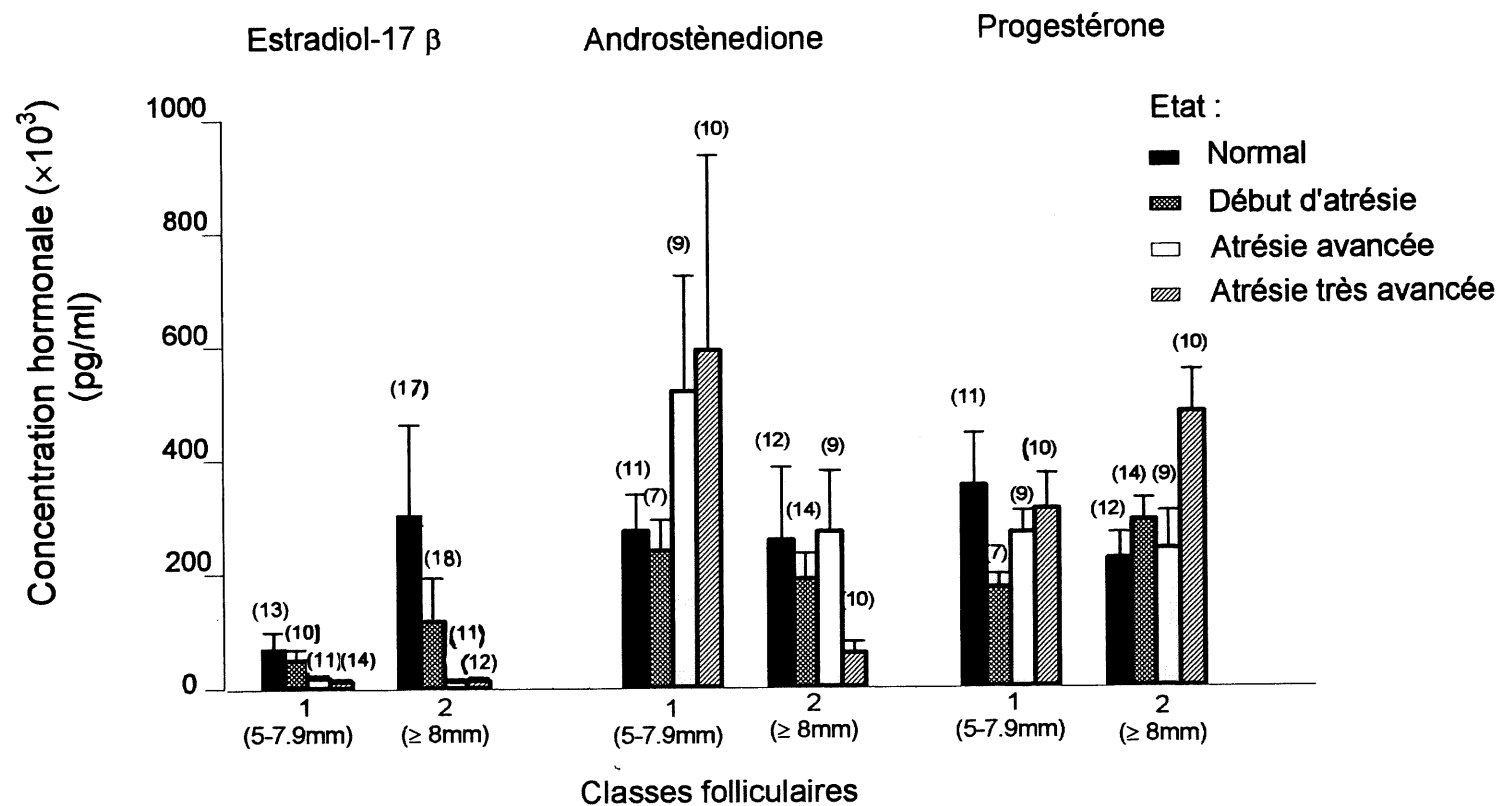


Figure 9 Concentration d'estradiol-17 $\beta$ , d'androstènedione et de progestérone mesurées dans le liquide folliculaire en fonction de l'état du follicule pour les deux classes folliculaires.

( ) Nombre de follicules.

Les analyses statistiques sont présentées au tableau 7.

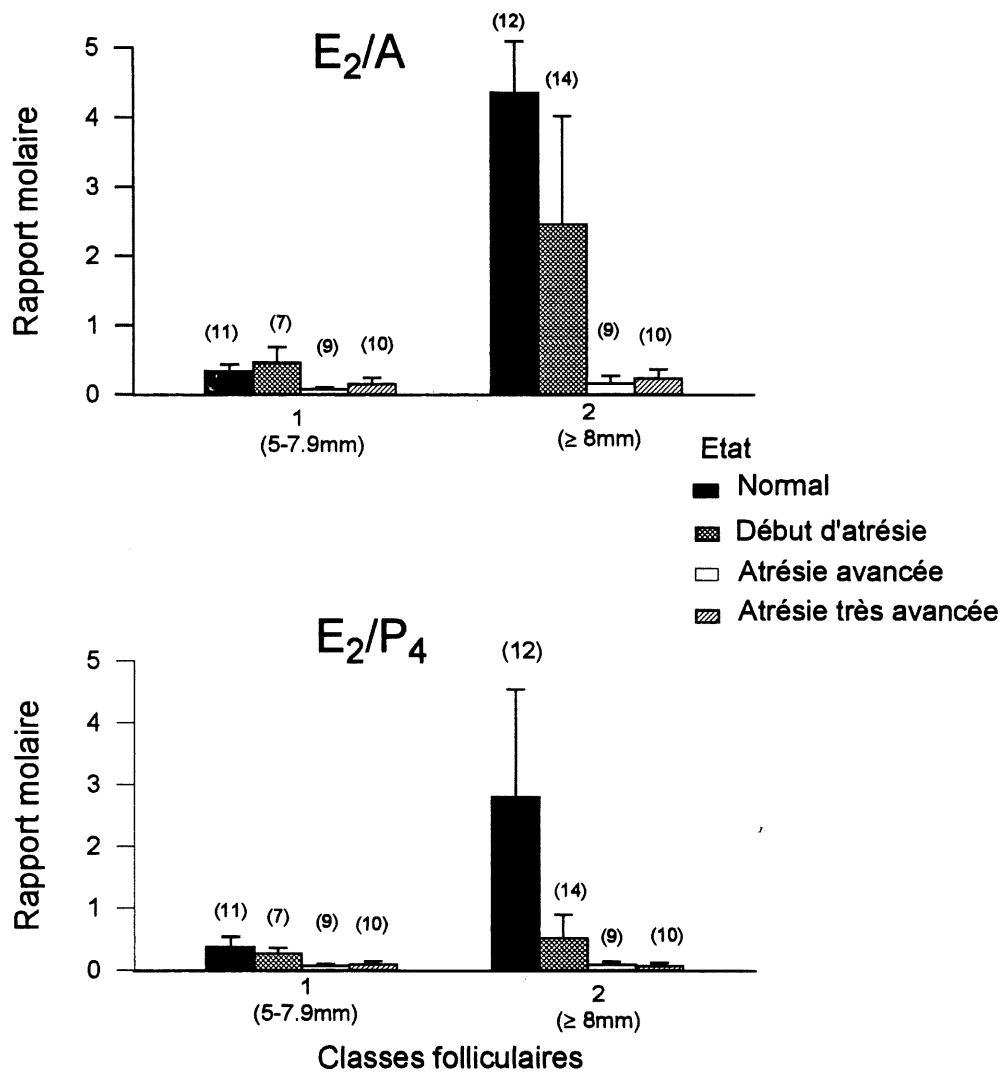


Figure 10 Rapport molaire des hormones stéroïdes du liquide folliculaire en fonction de l'état du follicule pour les deux classes folliculaires.

( ) Nombre de follicules.

Les analyses statistiques sont présentés au tableau 7.

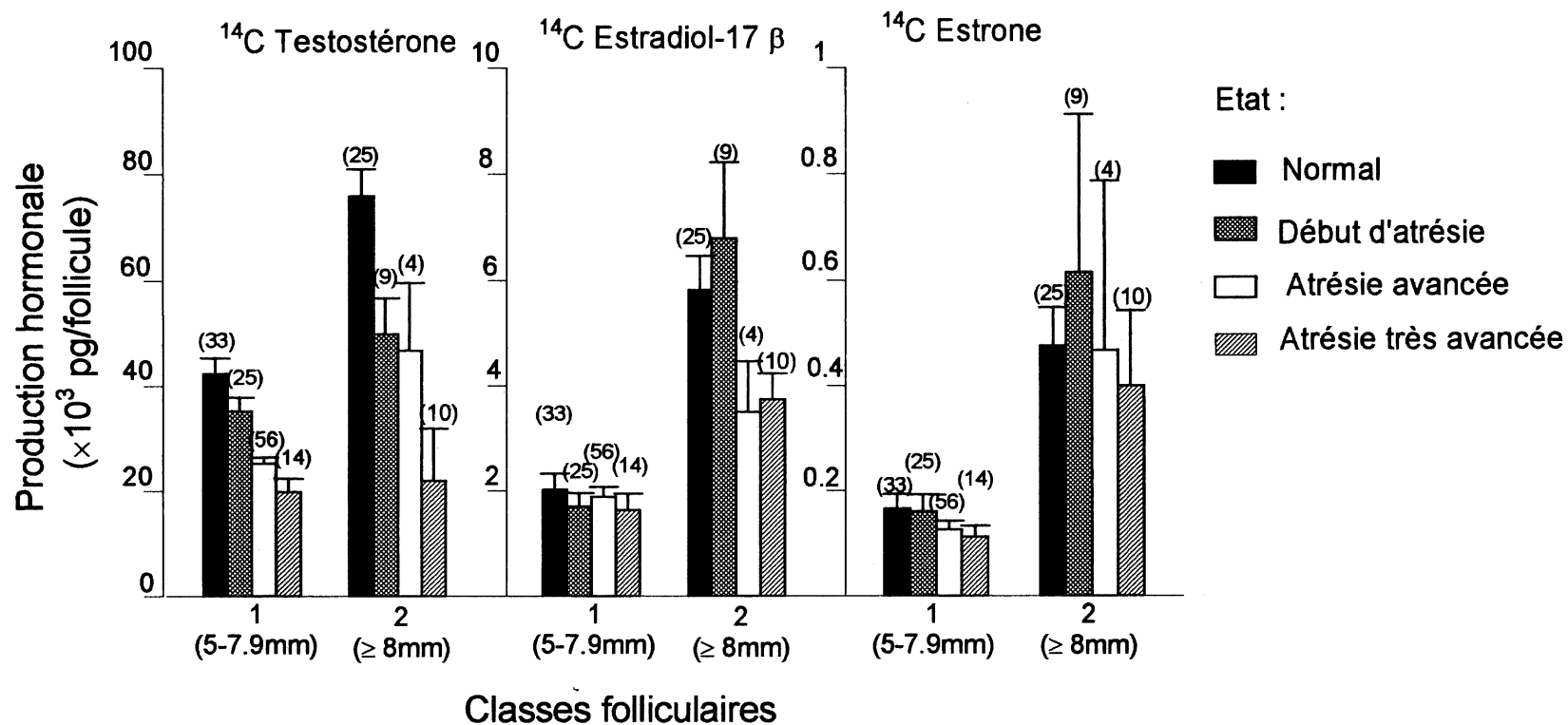


Figure 11 Concentration des hormones nouvellement synthétisées mesurées dans le volume total de milieu de culture et du liquide folliculaire en fonction de l'état pour les deux classes folliculaires.

( ) Nombre de follicules.

Les analyses statistiques sont présentées au tableau 11.



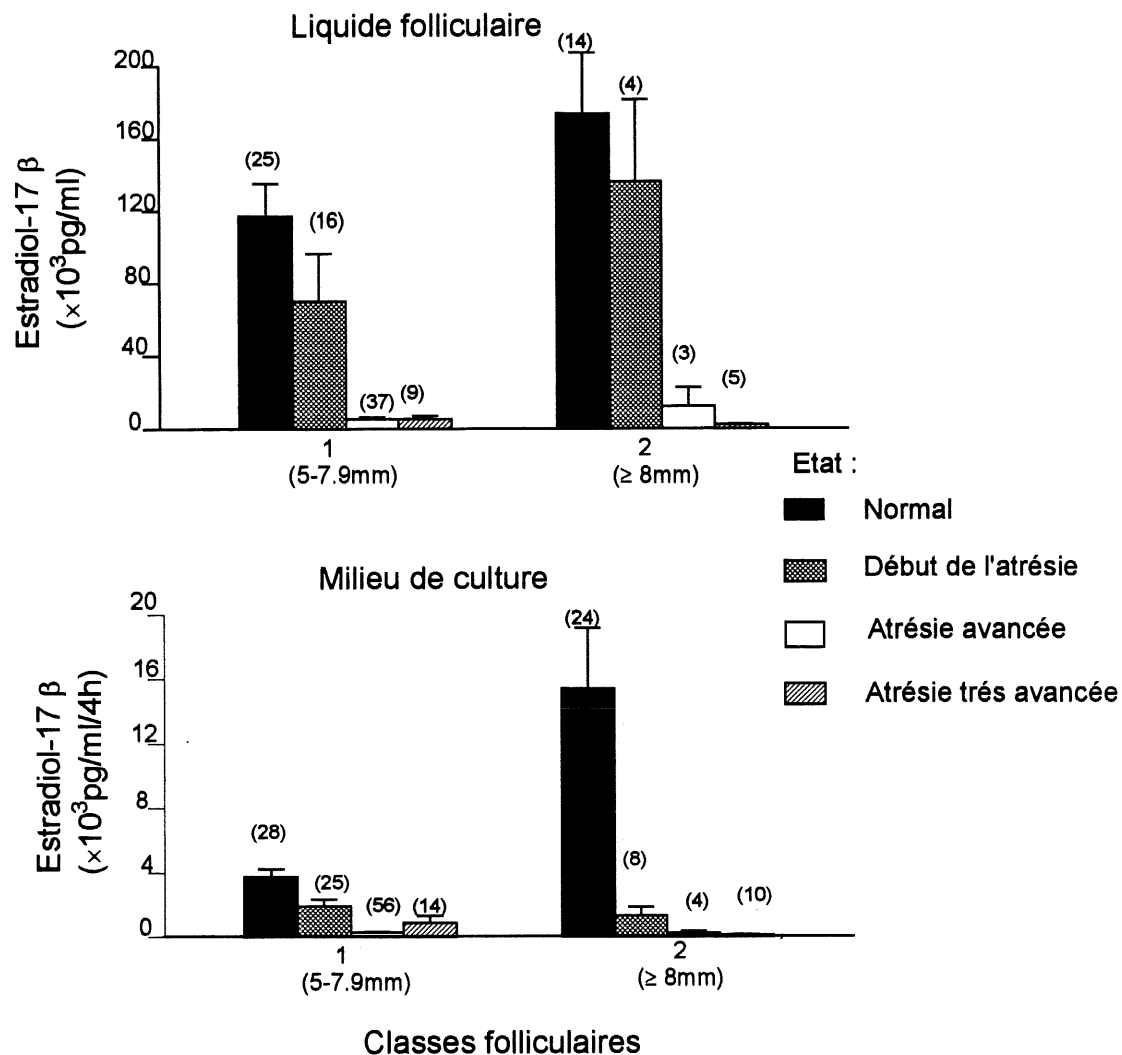


Figure 12 Concentration en estradiol-17 $\beta$  total (estradiol-17 $\beta$  +  $^{14}\text{C}$  estradiol-17 $\beta$ ) mesurée dans le liquide folliculaire et le milieu de culture en fonction de l'état pour les deux classes folliculaires.

( ) Nombre de follicules.

Les analyses statistiques sont présentées au tableau 11.

## **2.4 Discussion**

### **2.4.1 Caractéristiques histologiques de l'état folliculaire**

Chez les follicules que nous avons classés en début de l'atrésie, nous avons pu remarquer à partir de nos observations microscopiques de la granulosa, la présence de cellules que nous avons nommées prépycnoses. Ces cellules sont constituées d'un noyau entouré de cytoplasme et de membrane. Elles ont une grande ressemblance avec les leucocytes, ce qui pourrait ressembler aux résultats rapportant une invasion de la granulosa des follicules bovins de grande taille par des macrophages. Mais, ceci a été observé lors de l'atrésie avancée (Lobel et Lévy, 1968; AboulFadle et coll., 1974; Bukovsky et coll., 1978). Ces chercheurs ont émis l'hypothèse du rôle possible du système immunitaire dans l'atrésie folliculaire où les globules blancs viendraient absorber les débris après dégénérescence de la paroi folliculaire. Mais, dans notre cas il s'agit du début de l'atrésie. De plus, des études effectuées par immunohistochimie, dans notre laboratoire, ont montré qu'au fait il ne s'agit pas de globules blancs. Nous pensons alors que ces cellules représentent une étape intermédiaire de formation de noyaux pycnotiques ou des cellules en apoptose. En effet, Jolly et coll. (1994) suggèrent chez le bovin que l'apoptose peut se produire chez les follicules durant les stades les plus précoces de l'atrésie. Ces stades ont lieu avant même de pouvoir détecter d'autres changements morphologiques et biochimiques. La présence de ces cellules dites prépycnoses ou début des pycnoses constitue alors un nouveau critère de détermination du début de l'atrésie folliculaire. De plus, celles ci nous incitent à avancer

l'hypothèse qu'il se passe chez ce type de follicules un phénomène physiologique que nous ne retrouvons pas chez les follicules que nous avons classés non atresiques.

#### **2.4.2 Influence de l'état du follicule sur l'épaisseur de la thèque interne**

Sur le plan morphologique, plusieurs chercheurs ont rapporté un épaissement de la thèque interne en atresie primaire et secondaire et un épaissement ou un amincissement en atresie tertiaire (Rajakoski, 1960; Marion et coll. 1968 et Priedkalns et Weber 1968). Cependant, nos résultats montrent que l'épaisseur de cette couche cellulaire du follicule ne change pas avec l'état de ce dernier. Il nous paraît important de signaler que ce critère semble être cité pour les premières fois dans les travaux de Rajakoski (1960); Marion et coll. (1968) et Priedkalns et Weber (1968). Cependant, les niveaux de l'atresie décrits par ces auteurs correspondent, selon notre classification, à des niveaux très avancées de l'atresie. Or, à ces niveaux de l'atresie, il ne reste quasiment plus de granulosa. Il est alors possible que leur affirmation résulte du fait que l'épaisseur de la thèque à ces niveaux de l'atresie semble importante par comparaison à celle de la granulosa. D'ailleurs, ces chercheurs ne donnent aucun résultat numérique comparant les épaisseurs de la thèque interne selon l'état du follicule. Notre étude morphométrique quantitative ne supporte donc pas les affirmations des chercheurs précédemment cités, et nous devons conclure que l'épaisseur de la thèque interne ne change pas avec l'état du follicule. L'épaisseur de cette couche cellulaire n'est donc pas un bon critère d'évaluation de l'état folliculaire.

### **2.4.3 Influence de l'état du follicule sur l'épaisseur de la granulosa**

Nos résultats montrent que l'épaisseur de la granulosa diminue avec l'atrésie du follicule. Cette diminution est observée seulement en atrésie avancée ( $A_2$  et  $A_3$ ) et non pas en début de l'atrésie ( $A_1$ ). Nous ne pouvons comparer ces résultats avec les données de la littérature, puisque ces dernières ne fournissent pas de valeurs numériques concernant l'épaisseur de la granulosa selon l'état du follicule. Mais, nous tenons à remarquer que l'absence de la diminution de l'épaisseur de la granulosa en début de l'atrésie n'est pas surprenante. En effet, selon nos critères de détermination de l'état du follicule, le nombre de couches de cellules de la granulosa est le même pour les follicules non atrésiques que pour les follicules en début de l'atrésie (7 à 18 couches). Ce critère est différent de celui de Martin (1986); Grimes et coll. (1987); Maurasse et coll. (1985), qui ont classé les follicules ayant de 10 à 15 couches de cellules de la granulosa comme étant non atrésiques, alors que les follicules en début de l'atrésie ont de 7 à 10 couches cellulaires. Nous n'avons pas utilisé les mêmes critères que ces auteurs, car nos observations nous ont montré que parmi les follicules présentant 7 à 18 couches de cellules de la granulosa, certains follicules présentent des changements morphologiques très restreints, quoique constants (présence de cellules que nous avons nommées prépycnoses). Nous avons donc émis l'hypothèse que les follicules présentant ces caractéristiques seraient en début de l'atrésie. Même si d'un simple point de vue morphologique, ces changements sont plutôt mineurs. Nous allons donc vérifier qu'ils sont associés avec des changements physiologiques ou fonctionnels dans le follicule.

#### 2.4.4 Teneur hormonale et état folliculaire

Nos résultats montrent que la teneur du liquide folliculaire en androstènedione ne diminue que chez les follicules de grande taille en atresie avancée par comparaison à ceux en atresie très avancée. Ainsi à l'exception de cette diminution, nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par plusieurs chercheurs chez le bovin pour différentes classes de taille folliculaires (McNatty et al., 1984a; Ireland et Roche, 1983a; Martin, 1986; Grimes et al., 1987; Spicer et al., 1987; Rouillier, 1991). Toutefois, il est à mentionner que les travaux réalisés par la plupart de ces chercheurs ont porté sur les follicules non atresiques par opposition aux follicules atresiques sans tenir compte des différents niveaux d'atresie. Cela pourrait expliquer la différence de notre résultat par rapport à ceux de la littérature pour ce qui a trait à cette baisse d'androstènedione au dernier niveau d'atresie. Ainsi, compte tenu du fait que, en général, l'androstènedione du liquide folliculaire ne change pas avec l'état du follicule, cette hormone n'est donc pas un bon critère de correspondance avec les changements morphologiques survenant chez le follicule lors de son atresie.

En ce qui concerne la progestérone, à l'encontre des résultats de plusieurs chercheurs qui ont rapporté une augmentation de cette hormone dans le liquide folliculaire avec l'atresie chez le bovin (McNatty *et al.*, 1984a; Grimes *et al.*, 1987; Ireland et Roche, 1983a; Spicer *et al.*, 1987 et 1988), nous ne trouvons cette augmentation que lorsqu'on compare les follicules de grande taille en atresie avancée par rapport à ceux en atresie très avancée. Mais, nos résultats s'accordent avec

ceux de Martin (1986), du moins pour les follicules non atrésiques, ceux en début de l'atrésie et ceux en atrésie avancée. En effet, Martin (1986) a trouvé que la teneur hormonale du liquide folliculaire en  $P_4$  n'est pas influencée par l'état du follicule. Nous devons donc conclure que la progestérone du liquide folliculaire n'est pas un bon critère de correspondance entre l'activité physiologique du follicule et ses changements morphologiques au cours du phénomène de l'atrésie.

Par ailleurs, nous avons trouvé que le contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  diminue en atrésie avancée du follicule. Ce résultat confirme ceux rapportés par plusieurs équipes de recherche qui ont réalisé leurs études sur les follicules antraux bovins de moyenne et grande taille (McNatty et al., 1984a; Grimes et al., 1987; Ireland et Roche, 1983a; Spicer et al., 1987 et 1988; Martin, 1986). Cependant nos critères de détermination de l'atrésie diffèrent de ceux adoptés par ces chercheurs, notamment pour discriminer entre les follicules non atrésiques et les follicules qui commencent à s'engager dans ce processus. Mais, il ne faudrait pas perdre de vue que les chercheurs précédemment cités ne se sont pas particulièrement préoccupés des perturbations hormonales survenant au début du phénomène de l'atrésie. À ce propos, nous n'avons effectivement pas trouvé de différence de quantité d'estradiol-17 $\beta$  dans le liquide folliculaire entre les follicules non atrésiques et ceux que nous avons classés en début de l'atrésie. Mais, il est possible que même si le follicule est jugé histologiquement en début de l'atrésie, son liquide folliculaire contenait énormément d'estradiol dont l'accumulation s'est faite alors qu'il était sain. En effet, dans la littérature, on ne connaît ni la cinétique de vidange hormonale du

liquide folliculaire, ni le temps requis pour un follicule pour changer de l'état sain au début de l'atrésie. On pourrait imaginer qu'il est possible que le temps passé par les follicules dans cet état du début de l'atrésie soit très bref, si bien que même s'il y a un changement dans l'activité de stéroïdogénèse folliculaire associée avec le début de l'atrésie, celui-ci ne serait pas perçu en ce qui concerne l'estradiol 17- $\beta$  du liquide folliculaire.

D'autre part, cette absence de différence d'estradiol 17 $\beta$  du liquide folliculaire entre les follicules non atrésique et ceux qui débutent l'atrésie, nous pousse à croire que les signes histologiques de l'atrésie précèdent la perte de fonction de stéroïdogénèse du follicule, ce qui appuierait les suggestions de Grimes et al., 1987; Ireland et Roche, 1983b; Takagi et al., 1993. Ces chercheurs suggèrent en effet que les changements qualitatifs dans les indices histologiques de l'atrésie semblent précéder la perte de fonction de stéroïdogénèse chez les gros follicules antraux bovins (>10 mm de diamètre). Dans le même ordre d'idée, Carson et al., 1981 rapportent que les changements dans le modèle de stéroïdogénèse qui accompagnent l'atrésie chez la brebis, reflètent certains changements précoces dans la capacité fonctionnelle des follicules engagées dans l'atrésie, mais n'en sont pas nécessairement les causes primaires. En conclusion, l'estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire n'est pas un bon critère du début de l'atrésie folliculaire.

#### **2.4.5 Rapports molaires $E_2/A$ et $E_2/P_4$ et répartition des follicules selon leur état et leur activité estrogène définie par la valeur des rapports $E_2/A$ et $E_2/P_4$**

Quel que soit l'état folliculaire, la majorité des follicules de moyenne taille (au moins 82%), ont des rapports molaires  $E_2/A$  et  $E_2/P_4$  qui sont plus petits que 1,0. Ces follicules sont donc estrogènes inactifs. Nos résultats s'accordent avec ceux de Martin (1986), du moins pour le rapport molaire  $E_2/P_4$  où il a démontré que 81 % des follicules non atrésiques histologiquement et 89 % des follicules atrésiques sont estrogènes inactifs ( $E_2/P_4 < 1,0$ ) respectivement, et ce, pour les petits et moyens follicules bovins ( $< 8$  mm). Ceci n'est pas surprenant vu que chez les moyens follicules la teneur du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  est faible par comparaison à celle de l'androstènedione et de la progestérone. À cet égard, des chercheurs ont rapporté que le liquide folliculaire des moyens follicules est 8 fois moins riche (Rouillier, 1991) ou 4 fois moins riche (McNatty *et al.*, 1984a) en estradiol-17 $\beta$  que celui des gros follicules. Par contre, la teneur du liquide folliculaire en androstènedione (Rouillier, 1991; McNatty *et al.*, 1984a) est 3 fois plus grande chez les petits que chez les gros follicules, les moyens follicules étant intermédiaires pour cette hormone (McNatty *et al.*, 1984a). De plus, selon Rouillier (1991) la teneur en androstènedione du liquide folliculaire des moyens follicules est 6 fois plus grande que celle des follicules de grande taille. Ceci explique que le rapport molaire  $E_2/A$  des follicules de moyenne taille est inférieur à 1,0. En conclusion, chez les moyens follicules, il n'y a pas de corrélation positive entre l'état histologique et l'état physiologique par les rapports molaires  $E_2/A$  et  $E_2/P_4$  ( $> 1,0$  ou  $< 1,0$ ).



Chez les follicules non atrésiques de grande taille ( $\geq 8$  mm) le rapport molaire  $E_2/A$  est plus grand que 1,0 et baisse significativement dès le début de l'atrésie. Lors de son étude sur les gros follicules chez le veau impubère, Martin (1986) a également trouvé une baisse du rapport  $E_2/A$  dès le premier niveau de l'atrésie. Cependant, nous tenons à mentionner que les follicules classés en début de l'atrésie par ce chercheur présentent un indice pycnotique  $\geq 1$  % ce qui, selon nos critères, correspond à des follicules chez qui l'atrésie est plus avancée. Par ailleurs, nous avons trouvé que la fréquence des follicules avec un rapport molaire  $E_2/A < 1,0$  (donc estrogène inactif) est de 25 % chez les follicules normaux. Cette fréquence atteint 86 % chez les follicules en début de l'atrésie et 95 % chez les follicules très atrésiques. Il existe donc, chez les follicules de grande taille, une très bonne corrélation entre les indices histologiques de l'atrésie telle que nous l'avons définie et le rapport molaire  $E_2/A$ .

Par ailleurs, à l'encontre des travaux de Martin (1986), nous n'avons pas trouvé une bonne corrélation entre l'apparence microscopique des gros follicules et l'activité estrogène ( $E_2/P_4 > 1$  ou  $< 1$ ). Ceci est vrai en particulier chez les gros follicules non atrésiques histologiquement. En effet, nos résultats montrent que 25 % seulement de ces follicules ont un rapport molaire  $E_2/P_4 > 1$ , donc estrogènes actifs. Or, la moyenne de ce rapport molaire est près de 3. En fait, Cette moyenne résulte de seulement 2 follicules sur 12 qui ont un rapport molaire très élevé. De toute manière, nous avons trouvé que l'atrésie n'affecte pas la répartition des follicules estrogènes actifs par le rapport molaire  $E_2/P_4 > 1$ . Toutefois, lorsque nous avons abaissé la norme arbitraire d'activité estrogène définie par le rapport molaire  $E_2/P_4$  de 1,0 à 0,1 chez les follicules de grande

taille, nous avons montré que l'atrésie dès son début affecte l'activité estrogène. Cette dernière diminue de moitié au début de l'atrésie. Ainsi, l'activité estrogène définie par le rapport molaire  $E_2/P_4 > 0,1$  est une bonne méthode de discrimination de l'état atrésique du follicule. Certains chercheurs ont utilisé plutôt le rapport molaire  $P_4/E_2$  pour discriminer entre les gros follicules bovins normaux et atrésiques (Ireland et Roche, 1983b; Takagi et al., 1993; Grimes et al., 1987). Toutefois il existe une controverse pour l'utilisation de ce rapport  $P_4/E_2$ . En effet, Ireland et Roche (1983b) ont trouvé que 77 % des follicules  $P_4$ -dominants (FD avec  $P_4/E_2 > 1$ , diamètre  $\geq 10$  mm) ont des cellules de la granulosa avec des noyaux pycnotiques alors que 37,5 % des follicules  $E_2$ -dominants (FD avec  $P_4/E_2 < 1$ ) contiennent des cellules de la granulosa avec des noyaux pycnotiques. Ces chercheurs suggèrent alors que le rapport  $P_4/E_2$  dans le liquide folliculaire pourrait être une meilleure méthode de discrimination de l'état atrésique ou non du follicule que les estimations histologiques. En accord avec les résultats de Ireland *et al.* (1983b), Takagi et al. (1993) ont trouvé les mêmes ordres de fréquences de follicules  $P_4$ -dominants versus  $E_2$ -dominants parmi les follicules atrésiques. Mais, Grimes et coll. (1987) rapportent que les follicules antraux ( $> 5$  mm de diamètre) bovins avec un rapport molaire  $P_4/E_2$  supérieur à 10, dans le liquide folliculaire, sont toujours atrésiques alors que les rapports molaires de  $P_4/E_2$  inférieurs ou égaux à 10, ne sont pas bien corrélés avec les indices histologiques de l'atrésie. Ainsi, vu toutes ces controverses relatives à la fiabilité du rapport  $P_4/E_2$  pour discriminer entre l'état atrésique ou non du follicule, l'utilisation de ce rapport pour cette fin serait plutôt à déconseiller, sinon à utiliser avec beaucoup de prudence. C'est pour cela d'ailleurs que nous nous l'avons pas utilisé.

#### **2.4.6 Activités de synthèse hormonale par le follicule en culture selon son état histologique**

Nous sommes les premiers chercheurs à étudier l'activité de synthèse hormonale en culture des follicules. Toutefois, par extrapolation on pourrait comparer nos résultats à ceux obtenus dans la littérature à ce propos à partir des cellules de la granulosa en culture.

Chez les deux classes de follicules, l'atrésie avancée affecte la synthèse folliculaire de testostérone. Nous savons que cette synthèse s'effectue à partir du précurseur androstènedione, fourni dans le milieu de culture, grâce à l'enzyme 17- $\beta$  hydroxystéroïde dehydrogénase présent dans les cellules de la granulosa (Longton et Armstrong, 1994). Ainsi, la baisse de synthèse de testostérone pourrait s'expliquer par le fait que l'atrésie avancée se manifeste par une disparition, en grande partie sinon totale de la granulosa. La disparition de cette couche de cellules est alors accompagnée par celle du 17- $\beta$  hydroxystéroïde dehydrogénase. Toutefois, il est possible que cette enzyme reste emmagasiné dans le liquide folliculaire sous forme inactive après avoir quitté les cellules de la granulosa. Par ailleurs, l'atrésie avancée est accompagnée par une baisse de synthèse folliculaire d'estradiol-17 $\beta$  chez les follicules de grande taille seulement. Cette baisse proviendrait également de la disparition partielle ou totale de la granulosa, lieu de synthèse d'estradiol-17 $\beta$ . D'autre part, Chez les moyens follicules, la synthèse d'estradiol-17 $\beta$  est très faible même chez les follicules non atrésiques. En effet, l'enzyme p 450 aromatase, enzyme responsable de la conversion de la testostérone et de l'androstènedione en estradiol-17 $\beta$  et en estrone respectivement, n'est pas encore bien fonctionnelle chez ces follicules (Longton et

Armstrong, 1994). Ceci ne favorise pas la différence de synthèse d'estradiol-17 $\beta$  entre les follicules normaux et les follicules atrésiques de cette classe de taille folliculaire.

D'autre part, les gros follicules en début de l'atrésie synthétisent moins de testostérone que les follicules normaux. On devrait donc s'attendre à une diminution de synthèse folliculaire d'estradiol-17 $\beta$  par les follicules en début de l'atrésie par manque de précurseur testostérone. Or nos résultats montrent que ce n'est pas le cas. Peut-être pourrait-on expliquer cela par le fait qu'au départ les follicules non atrésiques présentent une activité de synthèse d'estradiol-17 $\beta$  assez faible en valeur absolue, ce qui camouflerait la différence de cette activité de synthèse entre les follicules non atrésiques et ceux qui débutent l'atrésie. En effet, lorsqu'on examine les marges de valeurs de concentrations en estradiol-17 $\beta$  nouvellement synthétisé par les follicules normaux, on trouve des valeurs de l'ordre de  $6 \times 10^3$  pg/follicule pour les gros follicules non atrésiques ( $\geq 8$  mm). Or, selon les estimations du nombre de cellules de la granulosa par follicule dans cette classe de taille (McNatty *et al.*, 1984b), les gros follicules normaux (ayant de 8 à 16 mm de diamètre) possèdent de  $10$  à  $24 \times 10^6$  cellules de la granulosa chez le bovin, donc une moyenne de  $13 \times 10^6$  cellules de la granulosa. Par ailleurs, ces mêmes chercheurs ont rapporté dans une autre étude (McNatty *et al.*, 1984a), en culture de cellules de la granulosa, que la synthèse en estradiol-17 $\beta$  en 3 heures est d'environ 50 à 100 ng/ $10^6$  cellules. Lorsqu'on extrapole nos résultats par  $10^6$  cellules, l'ordre de grandeur que nous trouvons concernant la synthèse d'estradiol-17 $\beta$  est d'environ 150 fois plus faible que les résultats de McNatty *et al.* (1984a) en culture de cellules de la granulosa. Notre système de culture de follicules a donc des limites. Il ne nous permet pas

d'obtenir une synthèse optimale d'estradiol-17 $\beta$  comparable à celle des cellules de la granulosa en culture. Ceci pourrait justifier l'absence de différence de synthèse d'estradiol-17 $\beta$  entre les gros follicules normaux et ceux qui débutent l'atrésie.

Par ailleurs, on assiste à une baisse de synthèse folliculaire et de teneur du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  chez les gros follicules très atrésiques par comparaison aux follicules normaux. Ceci pourrait refléter une réduction d'activité aromatasase existante dans cette population de follicules plutôt qu'à un défaut d'acquisition initiale de cette activité. Ainsi, d'après nos résultats, la diminution d'activité aromatasase folliculaire pourrait représenter un événement tardif de dégénérescence de gros follicules atrésiques. Ceci semble être en désaccord avec les propositions de McNatty et al. (1984a) et de Henderson et al. (1987). Ces chercheurs suggèrent que la réduction d'activité aromatasase est l'un des premiers changements détectables dans la fonction folliculaire à la suite du début de l'atrésie en culture de cellules de la granulosa et que cela a une importance majeure dans le processus de l'atrésie. Néanmoins, ne perdons pas de vue que nous ne définissons pas le début de l'atrésie sur le plan histologique de la même façon que les chercheurs précédemment cités l'ont fait. En effet, les follicules que nous avons classés en début de l'atrésie seraient histologiquement non atrésiques pour ces chercheurs. Ainsi, si on prend en considération cette différence de définition du début de l'atrésie, nous arriverons aux mêmes conclusions que ces chercheurs quant à la chronologie de la perte d'activité de l'aromatasase avec l'atrésie du follicule. On pourrait alors imaginer que la réduction d'activité aromatasase conduirait à

une augmentation de concentration folliculaire en androgène qui à son tour pourrait promouvoir le processus de l'atrésie aussi bien directement que par inhibition ultérieure d'activité aromatase.

D'autre part, selon nos résultats, nous remarquons que les follicules très atrésiques synthétisent quant même de l'estradiol-17 $\beta$ . Ce résultat est étonnant vu que ces cellules ne possèdent presque plus de granulosa et donc elles n'ont plus d'aromatase. McNatty (communication personnelle) avait trouvé des résultats similaires (résultats non publiés). Dans d'autres études, ce chercheur a montré que les cellules de la granulosa de tous les follicules atrésiques, indépendamment du grade de l'atrésie ou de la taille du follicule, présentent une faible activité aromatase ( $< 2 \text{ ng}/10^6 \text{ cellules}/3\text{h}$ ) (McNatty et al., 1984a). Il est alors possible que l'aromatase, après destruction de la granulosa à la suite de l'atrésie, passe dans le liquide folliculaire des follicules. Cette dernière permet l'aromatisation des androgènes en estradiol-17 $\beta$ .

#### **2.4.7 Relâche d'estradiol-17 $\beta$ total dans le milieu d'incubation selon l'état du follicule**

Les follicules atrésiques relâchent moins d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation que les follicules normaux et ce, pour les deux classes folliculaires. Cette diminution est observée de façon draconienne dès le début de l'atrésie. Elle est de l'ordre de 50% chez les moyens follicules et de 90 % chez les gros follicules débutant l'atrésie. Nos résultats confirment ceux d'autres chercheurs qui ont démontré que les follicules atrésiques relâchent moins d'estradiol-17 $\beta$  *in vitro* que les follicules normaux (brebis: Moor et al, 1978; Hay et Moor, 1978; Terqui et al, 1988;

vache: Rouillier, 1991; Zimmerman et al, 1988). De plus, Rouillier et al. (1991) suggèrent l'existence d'une corrélation positive entre la teneur d'estradiol-17 $\beta$  dans le liquide folliculaire et celle dans le milieu de culture pour l'ensemble des follicules ( $\geq 4,5$  mm; atresiques ou non). En ce qui concerne cette corrélation, nos résultats sont similaires à ceux de Rouillier (1991) en ce qui attrait à l'atresie avancée. Mais ceci n'est pas le cas au début de l'atresie où le liquide folliculaire, dans nos expériences, ne diffère pas de celui des follicules normaux en termes de concentration d'estradiol-17 $\beta$ , alors qu'une chute dramatique est observée dans les mêmes conditions au niveau de la relâche de cette hormone en culture.

Que se passe-t-il alors lors du début du processus de l'atresie? On pourrait penser que la perméabilité folliculaire à l'estradiol-17 $\beta$  est nettement atteinte dès qu'apparaissent les premiers signes morphologiques de l'atresie. Malheureusement, nous ne pouvons pas vérifier cette hypothèse en mesurant la synthèse de l'estradiol-17 $\beta$  dans les différents compartiments folliculaires séparément (liquide folliculaire et milieu de culture). En effet, dans des analyses statistiques préliminaires nous n'avons pas trouvé de différence entre les follicules normaux et ceux qui débutent l'atresie quant à l'estradiol-17 $\beta$  nouvellement synthétisé mesuré dans ces deux compartiments folliculaires séparément. Ceci résulte du fait que notre système de culture ne nous permet pas des conditions optimales de synthèse d'estradiol-17 $\beta$  par le follicule.

Par ailleurs, nous savons que dans les organes autres que l'ovaire, comme le pancréas, il a été démontré qu'une protéine dissulfure isomérase (PDI) (Grosman, communication personnelle)

lie l'estradiol au niveau cytoplasmique. Il en résulte que l'estradiol sous cette forme ne peut se fixer sur son récepteur cytoplasmique (Beaulieu, 1984), et il est ainsi neutralisé. Actuellement, nous ne savons pas si la PDI est présente dans l'ovaire puisque nous n'avons pas d'évidences dans la littérature à ce propos. Mais, il a été démontré que des protéines de liaisons présentes dans le cytoplasme des cellules se lient à l'estradiol, neutralisant ainsi ses effets (Longton et Armstrong, 1994). De ce fait, le complexe estradiol- protéine de liaison séjourne dans le cytoplasme qu'il ne pourrait quitter probablement à cause de la grosseur du complexe. On pourrait ainsi, imaginer que lors du début de l'atrésie, par un mécanisme inconnue, il se déclenche une synthèse de protéines de liaison d'estradiol-17 $\beta$  au niveau du cytoplasme des cellules folliculaires. Ces protéines auraient pour effet d'empêcher l'estradiol d'être facilement disponible pour diffuser hors des cellules ou du liquide folliculaire.

Par ailleurs, on pourrait envisager un autre mécanisme qui expliquerait la chute de relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation associée avec le début de l'atrésie. Ce mécanisme impliquerait un métabolisme de l'estradiol en ses dérivés sulfatés et glucoronés par exemple, le rendant ainsi inactif et non détectable par RIA. Si tel est le cas, le début de l'atrésie impliquerait alors la synthèse de facteurs à l'origine du métabolisme intracellulaire de l'estradiol-17 $\beta$ . Il reste alors à élucider le ou les mécanismes responsables de la forte baisse de relâche d'estradiol-17 $\beta$  chez les follicules débutant l'atrésie par comparaison aux follicules normaux. Toutefois, l'ampleur de cette baisse prouve effectivement que de légères modifications morphologiques qui se produisent au sein du follicule sont associées à des changements physiologiques.



En conclusion, les follicules normaux présentent au plus 5 pycnoses par section folliculaire. La présence de 10 à 25 pycnoses et de prépycnoses dans une section folliculaire correspond à un état qui représente effectivement le début du processus de l'atrésie. En effet, nous avons validé ces critères histologiques en établissant une bonne corrélation entre ces petites modifications morphologiques et des changements physiologiques qui se produisent dans le follicule. Ainsi, Sur le plan physiologique, le début de l'atrésie est caractérisé, chez les follicules de grande taille ( $\geq 8$  mm), par un rapport molaire  $E_2 / A$  qui est inférieur à 1, un rapport molaire  $E_2 / P_4$  qui est inférieur à 0,1 et par une baisse de synthèse *in vitro* de testostérone par le follicule. D'autre part, le début de l'atrésie est caractérisé, chez les deux classes de taille folliculaire, par une baisse draconienne de relâche *in vitro* d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation. Nous pouvons donc considérer maintenant et dans l'avenir que nos critères histologiques d'attribution du début de l'atrésie tels que nous les avons décrits sont des critères fiables.

### **3. Caractérisation de la hiérarchie des follicules dans l'ovaire de bovin**

#### **3.1 Introduction**

Toutes les études menées sur les follicules bovins par échographie suggèrent que l'une des causes de la régression des follicules serait l'impact du FD sur le développement des autres follicules de la cohorte (Saumande et al., 1978; Pierson et Guinther, 1987a; Savio et al., 1988; Sirois et Fortune, 1988; Grasso et al., 1989; Ginther et al., 1989; Knopf et al., 1989; Sirois et Fortune, 1990; Kastelic et al., 1990; Guilbault et al., 1991; Murphy et al., 1991; Huhtinen et al., 1992.). En 1992, Guilbault et collaborateurs ont démontré que la présence d'un FD physiologiquement actif et en croissance accélère le développement de l'atréisie chez les FS et diminue leur capacité à relâcher de l'estradiol-17 $\beta$  *in vitro*. Ce phénomène engendre une hiérarchie morphologique et physiologique parmi les follicules. Toutefois, cette étude était limitée à deux moments précis dans le cycle estral: le premier correspondant à la phase de croissance d'un FD ( $\geq 9$ mm) de la première vague folliculaire, et le deuxième correspondant à la phase de régression de ce même FD, soit lorsque son diamètre s'est stabilisé depuis au moins 4 jours. De plus cette étude était restreinte à la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu de culture. Dans nos travaux de recherche nous avons voulu reprendre cette étude de façon plus rigoureuse en utilisant les critères histologiques que nous avons déterminés dans le chapitre précédent de cette thèse. De plus, l'étude que nous allons entamer va couvrir tout le cycle estral de la vache.

### **3.1.1 Objectif de travail**

L'objectif général de cette section des travaux de recherche était d'évaluer l'impact de la présence d'un FD sur les caractéristiques histologiques et physiologiques des FS durant le cycle estral. Nous avons utilisé le système de classification établi au chapitre précédant pour déterminer l'état histologique des follicules en fonction de leur rang hiérarchique, (FD et FS), et pour les classer comme étant sains ou atrophiques (en confondant les différents niveaux de l'atrophie, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> ou A<sub>3</sub>).

## **3.2 Matériel et méthodes**

### **3.2.1 Matériel biologique**

Les ovaires recueillis par paires à l'abattoir, ont été manipulés selon la procédure décrite antérieurement (section 2.2.1).

### **3.2.2 Hiérarchie folliculaire sans culture des follicules**

Nous avons utilisé 26 paires d'ovaires d'abattoir pour déterminer les caractéristiques histologiques et physiologiques des follicules subordonnés en relation avec la présence et le statut du follicule dominant (FD) sur la paire d'ovaires. Ici le FD désigne le plus gros follicule > 11 mm, le FD est donc un terme abusif, mais on l'utilise quant même comme c'est le cas dans la littérature

courante. L'estimation du stade du cycle estral, où se situent les paires d'ovaires étudiées, a été basée sur l'apparence du corps jaune et la présence ou non d'un gros follicule dont le diamètre est supérieur à 11 mm (FD) (Voir tableau 12). Cette assignation des ovaires à un stade du cycle a été adaptée à partir du modèle de Ireland et al. (1980). Chaque stade est représenté par un type de paires d'ovaires. Ainsi, au début du cycle on note la présence de deux stades: un stade où il n'existe pas de follicule dominant (stade I) et un deuxième stade où un follicule dominant est toujours présent sur la paire d'ovaires (stade II). Au milieu ou à la fin, du cycle, les paires d'ovaires sont toujours porteuses de FD. Au milieu du cycle, il existe soit un seul FD sur la paire d'ovaires, c'est le stade III; soit deux FD, c'est le stade IV. A la fin du cycle, deux FD sont présents sur la paires d'ovaires, c'est le stade V. Nous tenons à préciser que les stades IV et V ne sont différents que par l'apparence du corps jaune (tableau 12); or nous ne nous sommes pas intéressés dans notre travail de recherche à l'effet du corps jaune sur les paramètres que nous avons étudiés. Nous avons de ce fait rassemblé ces deux stades (IV et V ) pour toutes les analyses que nous avons effectuées. Ainsi nous avons réparti les paires d'ovaires comme nous l'avons décrit dans le tableau 13.

Nous avons disséqué tous les follicules de la paire d'ovaires ayant un diamètre  $\geq 5$  mm. Les follicules (en nombre de 130) disséqués ont été congelé dans l'azote liquide. Ils ont subi l'histologie classique (voir section 2.2.2 pour la technique) pour déterminer l'état normal (N) ou atrophique ( $A_1$ ,  $A_2$  ou  $A_3$ ) du follicule selon les critères décrits dans la section 2.2.3. Nous avons ensuite mesuré les concentrations d'estradiol-17 $\beta$  et d'androstènedione dans le liquide folliculaire de ces follicules par RIA (comme nous l'avons décrit dans la section 2.2.7) sans extraction de ce

dernier, puis les valeurs estimées ont été corrigées en nous servant des résultats exposés dans la section 2.2.8. Les résultats ont été par la suite soumis aux analyses statistiques en utilisant le logiciel S.A.S (Statistical analysis system, 1989). Ces analyses étaient faites soit par analyse de proportions (test de  $\chi^2$ ) (pour la répartition des follicules subordonnés (FS) selon leur état et selon la présence et le statut histologique du follicule dominant (FD) durant le cycle estral), soit par analyse de variance en utilisant la procédure « General Linear Model » pour tout le reste des résultats; lorsque le nombre de groupes comparés était supérieur à 2 et que l'analyse de variance décelait une différence significative, un test de Duncan a été utilisé pour identifier les moyennes qui diffèrent les unes des autres. Pour normaliser la distribution, toutes les données ont été transformées en valeurs logarithmiques avant d'être soumises à l'analyse statistique. Les résultats présentés dans le texte ou dans les tableaux ont été retransformés en valeurs réelles.

### **3.2.3 Hiérarchie folliculaire après culture des follicules**

Nous avons voulu compléter l'étude présentée dans la section précédente par l'examen des hormones stéroïdes nouvellement synthétisées par le follicule et la relâche d'estradiol-17 $\beta$  en culture stationnaire. Par la suite, en utilisant ces paramètres physiologiques, nous avons consacré notre travail de recherche à l'établissement de certains critères qui vont nous permettre de détecter le futur FD au sein de la cohorte des follicules non atresiques en croissance. Pour ce faire, nous avons examiné dans un premier temps deux groupes de follicules non atresiques. Le premier provient des paires d'ovaires non porteuses de FD (stade I). Le deuxième groupe provient des paires d'ovaires porteuses d'un FD unique et atresique (stade III). Au sein de chaque

groupe de follicules, nous avons repéré, dans chaque paire d'ovaires individuellement, le follicule subordonné non atrésique ayant le plus grand diamètre. Nous avons ainsi constitué deux groupes de follicules subordonnés non atrésiques. Le premier est composé de l'ensemble des follicules subordonnés non atrésiques les plus gros (choisis dans chaque paire d'ovaires individuellement). Le deuxième groupe est composé de tous les autres follicules subordonnés non atrésiques de l'ensemble des paires d'ovaires. Nous avons par la suite soumis aux analyses statistiques, les caractéristiques physiologiques de ces deux groupes de follicules. Ensuite, nous avons choisi deux autres groupes de follicules sélectionnés parmi la population des follicules subordonnés non atrésiques provenant des paires d'ovaires situées aux stades I et III du cycle. Mais, dans ce cas, le premier groupe est constitué de l'ensemble des follicules subordonnés non atrésiques qui contiennent le plus d'estradiol-17 $\beta$  dans le liquide folliculaire dans chaque paire d'ovaires. Le deuxième groupe des follicules est composé de tous les autres follicules subordonnés non atrésiques des paires d'ovaires étudiées. Ces deux groupes de follicules contiennent respectivement  $248 \pm 12,4$  et  $108 \pm 16,8$  ng/ml d'estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire ( $p = 0,05$ ). Nous avons par la suite soumis aux analyses statistiques les caractéristiques physiologiques de ces deux groupes de follicules (voir tableau 22 ).

Enfin, à titre de vérification, nous avons voulu examiner l'effet du début de l'atrésie sur les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés (hormones stéroïdes nouvellement synthétisés par le follicule, contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  et relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu de culture). Mais, comme nous étions limités par la taille de la population des FS pour faire cette vérification à chaque stade séparément du cycle, nous nous ne l'avons alors

effectué que lorsqu'un FD est toujours présent. Mais dans ce cas, nous avons une population de FS qui est hétérogène. En effet, chaque groupe comparé est composé de FS qui proviennent de plusieurs stades (II + III + IV + V). Idéalement, la comparaison aurait dû se faire dans chaque stade séparément. Mais nous n'avions pas d'alternative. Cependant nous avons assez de FS pour comparer les FS non atrésiques de stade I avec ceux des stades II + III + IV + V. Nous avons alors pu vérifier si la présence d'un FD affectait les caractéristiques physiologiques des FS non atrésiques.

Ainsi, nous avons récolté 27 paires d'ovaires d'abattoir dont nous avons estimé le stade du cycle selon les critères du tableau 12. Comme dans la section précédente les stades IV et V ont été rassemblés pour toutes les analyses que nous avons effectuées. Nous avons ainsi réparti les paires d'ovaires comme nous l'avons décrit dans le tableau 14. Sur 27 paires d'ovaires, nous avons disséqué 187 follicules (tous les follicules  $\geq 5$  mm de diamètre). Après la dissection, ces follicules ont été mis individuellement en culture stationnaire dans les mêmes conditions que celles décrites dans la section 2.2.4. À la fin de l'incubation les follicules ont été congelés et coupés en deux pour servir d'une part à l'histologie (telle que décrite dans la section 2.2.2), d'autre part aux dosages hormonaux. Le milieu de culture a été prélevé aussi pour les dosages hormonaux. En effet, les hormones stéroïdes ( $^{14}\text{C}$  testostérone et  $^{14}\text{C}$  estradiol) ont été d'abord extraites (selon la technique décrite dans la section 2.2.9) du liquide folliculaire et du milieu de culture séparément puis séparées à l'aide de chromatographies en couches minces (technique décrite dans la section 2.2.10). L'estradiol- $17\beta$  total (marqué ou non au carbone 14) a été mesuré par RIA (tel que décrit dans la section 2.2.7) dans le liquide folliculaire d'une part et le milieu de culture d'autre

part. Les résultats ont été par la suite soumis aux analyses statistiques de la même manière que dans section 3.2.2.



Tableau 12 Estimation de la période du cycle par l'aspect du corps jaune et la présence ou non d'au moins un gros follicule de diamètre > 11 mm (FD). Adapté d'après les travaux de Ireland et al. (1980).

	Stade du cycle				
	Début du cycle		Milieu du cycle		Fin du cycle
	Stade I	Stade II	Stade III	Stade IV	Stade V
Présence de gros follicule: diamètre > 11 mm (FD)	Pas de FD	1 FD	1FD	2 FD	2 FD
Apparence du corps jaune	-Hémorragique (récemment ovulé)  - Point de rupture non couvert d'épithélium  - Pas de vascularisation  - Diamètre de 0,5 à 1,5 cm	- Hypertrophie autour du point de rupture: couronne rouge vive. - Point de rupture couvert d'épithélium  - Début de vascularisation  - Diamètre de 1,6 à 2 cm	- Orange ou orange violacé: couronne rosée de moins en moins évidente - Disparition du point de rupture.  - Bonne vascularisation  - Diamètre de 1,6 à 2 cm	- Jaune ou blanc: couronne disparue    - La vascularisation n'est plus visible - Diamètre < 1 cm	

FD = follicules dominants

Tableau 13 Répartition des follicules  $\geq 5$  mm étudiés selon le stade du cycle et l'état de la paire d'ovaires.

État de la paire d'ovaires	Stade du cycle			
	Début du cycle		Milieu du cycle	Milieu et fin du cycle
	Stade I	Stade II	Stade III	Stade IV+V
Présence de FD	0	41	17	52
Absence de FD	20	0	0	0
Nombre de paires d'ovaires	5	8	3	10

FD = follicules dominants

Tableau 14 Répartition des follicules  $\geq 5$  mm étudiés selon le stade du cycle.et l'état de la paire d'ovaires (follicules destinés à la culture).

État de la paire d'ovaires	Stade du cycle			
	Début du cycle		Milieu du cycle	Milieu et fin du cycle
	Stade 1	Stade II	Stade III	Stade IV+V
Présence de FD	0	58	21	77
Absence de FD	31	0	0	0
Nombre de paires d'ovaires	5	7	4	11

FD = follicules dominants

### **3.3 Hiérarchie folliculaire sans culture des follicules**

#### **3.3.1 Resultats**

#### **3.3.2 Présence et statut histologique du follicule dominant durant le cycle estral**

Selon Le tableau 15 nous voyons qu'au stade I (début du cycle tel que nous l'avons défini), le follicule dominant est absent sur la paire d'ovaires. Par contre, au stade II (début avancé du cycle), on note la présence d'un seul follicule dominant sur la paire d'ovaires et celui-ci est non atrésique. Par ailleurs, lorsqu'on s'avance dans le cycle estral (milieu et fin du cycle), nous observons deux catégories de paires d'ovaires. Dans la première, nous notons la présence d'un seul follicule dominant, ce dernier étant atrésique (stade III). Dans l'autre catégorie de paires d'ovaires, il existe deux follicules dominants. L'un de ces follicules dominant est classé histologiquement normal, tandis que l'autre est histologiquement atrésique (stades IV et V).

#### **3.3.3 Concentration des stéroïdes dans le liquide folliculaire des follicules dominants selon leur statut**

La concentration du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  des follicules dominant normaux est six fois plus élevée que celle des follicules dominants atrésiques ( $p = 0,0001$ , tableau 16). Mais, la concentration du liquide folliculaire en androstènedione ne change pas avec l'état du FD (tableau 16).

### **3.3.4 Influence de la présence et du statut histologique du follicule dominant sur la répartition des follicules subordonnés selon leur état, durant le cycle estral**

Dans le tableau 15, nous voyons qu'au stade I, la majorité des follicules subordonnés (FS) sont normaux (95%). Par contre, au stade II on trouve un taux élevé de follicules atrophiques au sein des follicules subordonnés de la cohorte folliculaire (97% des follicules). Par ailleurs, Les résultats montrent qu'au stade III, la plupart des follicules subordonnés (79%) sont normaux. Par contre, aux stades IV et V, la plupart des follicules subordonnés sont atrophiques (75%)

### **3.3.5 Influence de la présence et du statut histologique du follicule dominant sur les concentrations du liquide folliculaire des follicules subordonnés en estradiol-17 $\beta$ et en androstènedione**

Dans cette section, nous comparons l'activité œrogène des follicules subordonnés (FS) présents sur la paire d'ovaires durant trois stades différents du cycle estral tel que présentés dans le tableau 17. Ce sont les stades I, II, et III.

Les résultats montrent que les follicules subordonnés du stade II ont un diamètre plus grand que celui des follicules subordonnés du stade I ( $p = 0,01$ ) ( tableau 17). D'autre part, les liquides folliculaires des follicules subordonnés du stade I et du stade III sont similaires quant à leur contenu en estradiol-17 $\beta$ . Rappelons que dans ces deux cas, on note, soit l'absence de follicule dominant, soit la présence d'un follicule dominant atrophique sur la paire d'ovaires (tableau 17). Ces deux types de follicules subordonnés ont par contre un liquide folliculaire qui est près de

6 fois plus riche en estradiol-17 $\beta$  que celui des follicules subordonnés du stade II ( $p = 0,004$ ). Ce stade est caractérisé par la présence d'un follicule dominant non atrophique sur la paire d'ovaires (tableau 17). En ce qui concerne l'androstènedione du liquide folliculaire des follicules subordonnés, nous voyons que l'analyse statistique ne détecte aucune différence significative entre les follicules subordonnés des trois stades. Autrement dit, la présence et le statut histologique du follicule dominant sur la paire d'ovaires n'influence pas le contenu du liquide folliculaire des follicules subordonnés en androstènedione (tableau 17).

### **3.4 Hiérarchie folliculaire après culture des follicules**

#### **3.4.1 Résultats**

#### **3.4.2 Structure des cellules de la granulosa après ou sans culture des follicules**

La figure 13 représente deux photographies réalisées au microscope optique sur des coupes de follicules passant par la granulosa. Ces deux coupes montrent des follicules non atrophiques. Le grossissement réel des cellules de la granulosa qui apparaissent sur les deux photographies est de 1690  $\times$ . La photographie du haut (A) est obtenue à partir d'un follicule non incubé, tandis que celle du bas (B) est réalisée à partir d'un follicule ayant subi la technique d'histologie après une durée de culture stationnaire de quatre heures. Nous voyons bien que les cellules de la granulosa de ces deux types de follicules ont une structure histologique similaire.

### **3.4.3 Présence et statut histologique du follicule dominant durant le cycle estral**

Comme nous pouvons le voir au tableau 18, au stade I (début du cycle tel que nous l'avons défini), le follicule dominant est absent sur la paire d'ovaires. Par contre, au stade II (début avancé du cycle), un follicule dominant unique et histologiquement non atrophique est présent sur la paire d'ovaires. Par ailleurs, au milieu et fin du cycle, nous trouvons deux sortes de paires d'ovaires. Soit des paires d'ovaires porteuses d'un seul follicule dominant et qui est histologiquement atrophique (stade III). Soit des paires d'ovaires porteuses de deux follicules dominants. L'un de ces follicules dominant est classé histologiquement normal, tandis que l'autre est histologiquement atrophique (stades IV et V).

### **3.4.4 Influence de la présence et du statut histologique du follicule dominant sur la répartition des follicules subordonnés selon leur état après culture**

Nous pouvons constater, en examinant le tableau 18 qu'au stade I, 84% des follicules subordonnés sont normaux. Par contre, au stade II (début avancé du cycle), 90% des follicules subordonnés sont atrophiques. Par ailleurs, au milieu du cycle, (stade III), 71% des follicules subordonnés sont normaux. Mais, 91% des follicules subordonnés sont atrophiques dans le cas où la paire d'ovaires est estimée au stade IV ou V.

### **3.4.5 Production folliculaire en stéroïdes, contenu du liquide folliculaire et relâche d'estradiol-17 $\beta$ dans le milieu de culture après 4 heures d'incubation**

#### **3.4.5.1 Follicules dominants**

Comme on peut le voir dans le tableau 19, les FD normaux ont une taille significativement inférieure à celle des FD atrésiques ( $p = 0,05$ ). Ce même tableau rapporte les résultats concernant la production des stéroïdes par les FD selon leur statut histologique. Ces hormones sont la  $^{14}\text{C}$  testostérone et le  $^{14}\text{C}$  estradiol-17 $\beta$ . Nous remarquons que les FD normaux synthétisent significativement plus de  $^{14}\text{C}$  testostérone que les FD atrésiques ( $p = 0,0001$ ). Ceci n'est cependant pas vrai dans le cas de la synthèse en  $^{14}\text{C}$  estradiol-17 $\beta$  par le follicule dominant dont l'état histologique ne semble pas avoir d'effet ( $p = 0,49$ ). Par ailleurs, la concentration d'estradiol-17 $\beta$  total (marqué ou non au carbone 14) mesurée par RIA dans le liquide folliculaire est trois fois plus élevée chez les FD normaux que chez les FD atrésiques ( $p = 0,002$ ). Dans le cas de l'estradiol-17 $\beta$  total relâché dans le milieu d'incubation les FD normaux relâchent 33 fois plus que les FD atrésiques ( $p = 0,0001$ ).

#### **3.4.5.2 Influence de la présence et du statut histologique du FD sur les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés**

Les paramètres physiologiques que nous examinons dans cette section concernent les follicules subordonnés des trois stades du cycle estral tel que présentés dans le tableau 20. Les résultats montrent que les diamètres des follicules subordonnés présents sur la paire d'ovaires,



durant les trois stades (stade I, stade II et stade III) ne sont pas différents ( $p = 0,41$ ). D'autre part, les résultats de la synthèse de  $^{14}\text{C}$  testostérone et  $^{14}\text{C}$  d'estradiol-17 $\beta$  par les follicules en culture durant ces trois stades du cycle montrent une plus faible quantité de testostérone nouvellement synthétisée par les follicules subordonnés de stade II que par ceux de stades I et III du cycle estral ( $p = 0,02$ ) (tableau 20). Néanmoins, nous n'avons pas décelé de différence de quantité de testostérone synthétisée par ces deux types de follicules subordonnés (stade I et stade III). D'autre part, les nouvelles synthèses d'estradiol-17 $\beta$  folliculaire, effectuées par les follicules subordonnés de ces trois stades du cycle, ne sont pas différentes.

Le tableau 20 illustre également les valeurs d'estradiol-17 $\beta$  total (marqué ou non au carbone 14) mesurées dans le liquide folliculaire et dans le milieu de culture pour les follicules subordonnés des trois stades du cycle précédemment décrits. Ainsi, les follicules subordonnés du deuxième stade sont moins riches en d'estradiol-17 $\beta$  ( $p = 0,0001$ ) que ceux du stade I et du stade III. Cependant, les follicules subordonnés de ces deux derniers stades sont similaires quant à leur contenu du liquide folliculaire en d'estradiol-17 $\beta$ . Ce même patron est observé dans le cas de la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu de culture par les follicules subordonnés ( $p = 0,002$ ) où les follicules subordonnés de stade II relâchent environ cinq fois moins d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation que ceux des stades I et III. Par contre, les follicules subordonnés de ces deux derniers stades sont similaires pour la relâche d'estradiol-17 $\beta$ .

### **3.4.6 Critères de détection du futur FD au sein de la cohorte des follicules en croissance**

#### **3.4.6.1 Influence du diamètre**

Dans le tableau 21 nous présentons deux groupes des follicules. Le groupe intitulé FS-NA 1 est constitué des follicules subordonnés non atrésiques les plus gros de chaque paire d'ovaires des stades I et III. Tandis que le groupe des follicules intitulé FS-NA 2 est constitué de tous les autres follicules subordonnés non atrésiques des stades I et III. Les résultats montrent (tableau 21) que ces deux groupes de follicules sont similaires pour tous les paramètres physiologiques étudiés. Ces paramètres sont, d'une part, les nouvelles synthèses folliculaires de testostérone et d'estradiol-17 $\beta$  après 4 heures d'incubation, et d'autre part le contenu du liquide folliculaire et la relâche d'estradiol-17 $\beta$  total dans le milieu de culture. Il en découle que la taille du follicule n'est pas un bon critère pour repérer le futur follicule dominant de la cohorte des follicules.

#### **3.4.6.2 Follicule subordonné de la paire d'ovaires qui est non atrésique et le plus riche en estradiol-17 $\beta$ du liquide folliculaire**

Dans le tableau 22, nous présentons les résultats concernant les paramètres physiologiques étudiés dans deux groupes de follicules subordonnés non atrésiques. Le groupe FS-NA 3 est constitué de l'ensemble des follicules subordonnés non atrésiques des stades I et III qui présentent le plus d'estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire dans chaque paire d'ovaires. Le groupe

FS-NA 4 est composé de tous les autres follicules subordonnés non atrésiques des stades I et III. Les résultats montrent (tableau 22) que la taille de ces deux types de follicules subordonnés, et leur quantité folliculaire de  $^{14}\text{C}$  testostérone ou de  $^{14}\text{C}$  estradiol-17 $\beta$  nouvellement synthétisés en culture, ne sont pas différentes. Ceci n'est pas le cas pour la relâche d'estradiol-17 $\beta$  total dans le milieu d'incubation. En effet, les FS-NA 3 relâchent près de 3 fois plus d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu de culture que les FS-NA 4 ( $p = 0,03$ ) (voir tableau 22).

### **3.4.7 Influence de la présence du FD sur les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés non atrésiques**

Les follicules subordonnés non atrésiques de stade I ont un diamètre plus faible que celui des follicules subordonnés non atrésiques du reste du cycle ( $p = 0,007$ , tableau 23). Cependant, aucune différence significative n'a été décelée parmi les caractéristiques physiologiques étudiées pour ces deux groupes de follicules subordonnés. Ces caractéristiques sont les synthèses folliculaires en testostérone et en estradiol-17 $\beta$  d'une part, le contenu du liquide folliculaire et la relâche dans le milieu de culture d'estradiol-17 $\beta$  total d'autre part (tableau 23).

### **3.4.8 Influence du début de l'atrésie sur les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés**

Le tableau 24, présente les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés durant la période du cycle où un FD est toujours présent (stade II + III + IV + V). Durant cette

période, nous comparons les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés non atrésiques et des follicules subordonnés en début de l'atrésie. Nous trouvons ainsi, que ces deux types de follicules subordonnés ne diffèrent pas quand à leur diamètre ( $p = 0,29$ ). Mais, la synthèse de  $^{14}\text{C}$  testostérone et de  $^{14}\text{C}$  estradiol- $17\beta$  des follicules subordonnés normaux est plus élevée ( $p = 0,05$ ) que celle des follicules subordonnés en début de l'atrésie. Quant au contenu du liquide folliculaire et la relâche dans le milieu d'incubation en estradiol- $17\beta$  total de ces deux types de follicules subordonnés, les résultats ne sont pas les mêmes. En effet, le début de l'atrésie ne semble pas avoir d'effet sur la teneur du liquide folliculaire en estradiol- $17\beta$  lorsqu'un FD est toujours présent sur la paire d'ovaires. Par contre, nous observons une baisse significative (de l'ordre de 5 fois) de la relâche d'estradiol- $17\beta$  dans le milieu de culture avec le début de l'atrésie ( $p = 0,002$ ) des follicules subordonnés durant cette période du cycle.

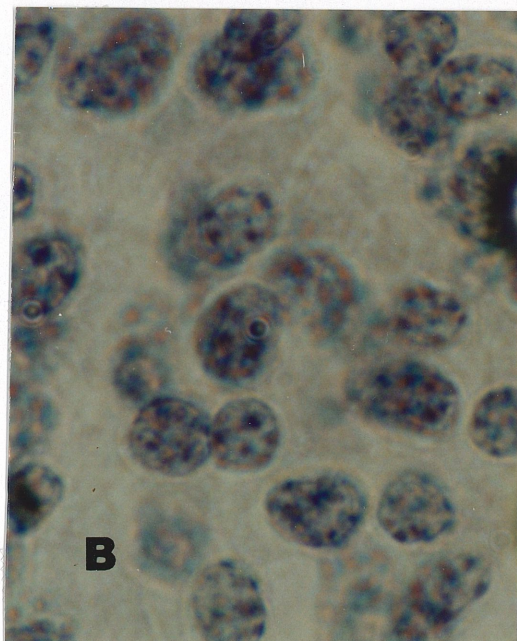
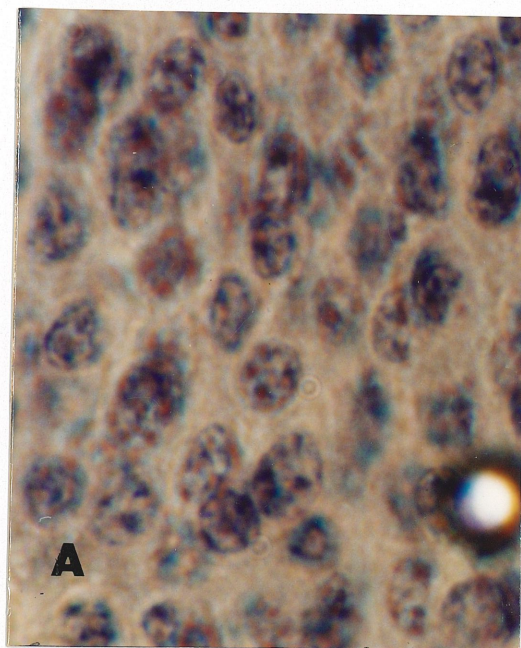


Figure 13 Coupes transversales de follicules normaux montrant les cellules de la granulosa (1690  $\times$ ).

A : Follicules normaux non mis en culture.

B : Follicules normaux ayant subi 4 heures de culture stationnaire.

Tableau 15 Répartition des follicules (FS) (nombre) selon leur état et selon la présence et le statut histologique du follicule dominant (FD) durant le cycle estral.

Etat du follicule <sup>1</sup>	Stade du cycle			
	Début du cycle		Milieu du cycle	Milieu et fin du cycle
	Absence de FD	Présence d'un: FD-NA	Présence d'un: FD-A	Présence de 2 FD: FD-NA et FD-A
	Stade I	Stade II	Stade III	Stade IV et V
FS-NA	19	1	11	8
FS-A	1	32	3	24
% FS-A	5	97	21	75
Probabilité	p < 0,01			

FS-A= Follicules subordonnés atrésiques.

FS-NA= Follicules subordonnés non atrésiques.

FD-A= Follicules dominants atrésiques.

FD-NA= Follicules dominants non atrésiques.

<sup>1</sup>= L'état du follicule est déterminé après dissection.

Tableau 16      Effet du statut histologique <sup>1</sup> du follicule dominant FD sur sa concentration en estradiol-17 $\beta$  et en androstènedione mesuré dans le liquide folliculaire.

Paramètres	FD Normaux	FD Atrésiques	Probabilité
Diamètre (mm) (n) <sup>2</sup>	12,5 $\pm$ 0,5 (17)	11,9 $\pm$ 0,7 (14)	0,50
E <sub>2</sub> -17 $\beta$ (ng / ml)	367 $\pm$ 120	58 $\pm$ 44	0,0001 *
Androstènedione (ng/ml)	184 $\pm$ 61	92 $\pm$ 29	0,28

<sup>1</sup> l'état du follicule est déterminé après dissection.

<sup>2</sup> (n) = nombre de follicules.

\* = Probabilité significative.

Tableau 17 Effet de la présence et du statut histologique et physiologique du follicule dominant (FD) sur la concentration en estradiol-17 $\beta$  et en androstènedione du liquide folliculaire des follicules subordonnés (FS).

Paramètres	FS du stade I (absence de FD)	FS du stade II: (présence d'un FD - NA)	FS du stade III (présence d'un seul FD: FD - A)	Probabilité
Diamètre (mm) (n) <sup>1</sup>	6,4 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup> (20)	7,5 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup> (33)	7,2 $\pm$ 0,3 <sup>a b</sup> (14)	0,01 *
E <sub>2</sub> -17 $\beta$ (ng / ml)	60 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	10 $\pm$ 3,8 <sup>b</sup>	55 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	0,004 *
Androstènedione (ng / ml)	257 $\pm$ 62	460 $\pm$ 108	168 $\pm$ 57	0,38

FD-NA = follicule dominant non atrésique.

FD-A = follicule dominant atrésique.

<sup>1</sup> (n) = nombre de follicules.

<sup>a b</sup> : Pour le même paramètre, des lettres différentes indiquent une différence significative (\*).



Tableau 18 Répartition des follicules subordonnés (FS) (nombre) selon leur état et selon la présence et le statut histologique du follicule dominant (FD) à différents stades du cycle estral.

Etat du follicule <sup>1</sup>	Stade du cycle			
	Début du cycle		Milieu du cycle	Milieu et fin du cycle
	Absence de FD	Présence d'un FD: FD-NA	Présence d'un FD: FD-A	Présence de 2 FD: FD-NA et FD-A
	Stade I	Stade II	Stade III	Stade IV et V
FS-NA	26	5	12	5
FS-A	5	46	5	50
% FS-A	16	90	29	91
Probabilité	p < 0,01			

FS-A= Follicules subordonnés atresiques.

FS-NA= Follicules subordonnés non atresiques.

FD-A= Follicules dominants atresiques.

FD-NA= Follicules dominants non atresiques.

<sup>1</sup> L'état du follicule est déterminé après culture.

Tableau 19 Effets du statut histologique <sup>1</sup> du follicule dominant FD sur la production des stéroïdes et la concentration du liquide folliculaire et du milieu de culture en estradiol-17 $\beta$  total.

Paramètres	FD Normaux	FD Atrésiques	Probabilité
Diamètre (mm) (n) <sup>2</sup>	11,7 $\pm$ 0,4 (18)	13,3 $\pm$ 0,7 (15)	0,05 *
<sup>14</sup> C Testostérone (ng / follicule) <sup>3</sup>	81 $\pm$ 6	28 $\pm$ 7	0,0001 *
<sup>14</sup> C E <sub>2</sub> -17 $\beta$ (ng / follicule) <sup>3</sup>	6 $\pm$ 0,8	5,6 $\pm$ 0,9	0,49
Estradiol-17 $\beta$ total (liq. foll.) (ng/ml)	177 $\pm$ 37	56 $\pm$ 30	0,002 *
Estradiol-17 $\beta$ total (M. de culture) (ng/ml/4h)	15,6 $\pm$ 5	0,46 $\pm$ 0,28	0,0001 *

FD = follicules dominants.

Estradiol-17 $\beta$  total = E<sub>2</sub>-17 $\beta$  + <sup>14</sup>C E<sub>2</sub>-17 $\beta$ .

<sup>1</sup> L'état du follicule est déterminé après culture.

<sup>2</sup> (n) = nombre de follicules.

<sup>3</sup> production du stéroïde mesurée dans le volume total.  
du liquide folliculaire plus le milieu de culture.

\* = Probabilité significative.

Tableau 20

Effets de la présence et du statut histologique et physiologique du follicule dominant (FD) <sup>1</sup> sur la production des follicules subordonnés (FS) en stéroïdes et la concentration de ces derniers en estradiol-17 $\beta$  total du liquide folliculaire et du milieu de culture.

Paramètres	FS du stade I (absence de FD)	FS du stade II: (présence d'un FD - NA)	FS du stade III (présence d'un seul FD: FD - A)	Probabilité
Diamètre (mm) (n) <sup>2</sup>	6,0 $\pm$ 0,2 (30)	6,2 $\pm$ 0, 2 (43)	5,8 $\pm$ 0, 2 (13)	0,41
<sup>14</sup> C T (ng / follicule) <sup>3</sup>	36,8 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	25 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	34 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	0,02 *
<sup>14</sup> C E <sub>2</sub> -17 $\beta$ (ng / follicule) <sup>3</sup>	1,9 $\pm$ 0,39	1,6 $\pm$ 0,19	1,6 $\pm$ 0,19	0,91
Estradiol-17 $\beta$ total (liq. foll.) (ng/ml)	115 $\pm$ 19,5 <sup>a</sup>	6,9 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>	138 $\pm$ 38 <sup>a</sup>	0,0001 *
Estradiol-17 $\beta$ total (M. de culture) (ng/ml/4h)	3,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	2,6 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	0,002 *

FD-NA = follicule dominant non atrophique.

FD-A = follicule dominant atrophique.

E<sub>2</sub>-17 $\beta$  + <sup>14</sup>C E<sub>2</sub>-17 $\beta$  = estradiol-17 $\beta$  total.

<sup>1</sup> L'état du follicule est déterminé après culture.

<sup>2</sup> (n) = nombre de follicules.

<sup>3</sup> Production du stéroïde mesurée dans le volume total.  
du liquide folliculaire plus le milieu de culture.

<sup>a b</sup> : Pour le même paramètre, des lettres différentes indiquent une différence significative (\*).

Tableau 21 Comparaison des stéroïdes du follicule subordonné (FS) histologiquement <sup>1</sup> non atresique le plus gros de la paire d'ovaires avec ceux des autres FS non atresiques en absence d'un follicule dominant (FD) ou en présence d'un FD histologiquement <sup>1</sup> atresique et physiologiquement inactif.

Paramètres	FS-NA 1	FS-NA 2	Probabilité
Diamètre (mm) (n) <sup>2</sup>	6,8 ± 0,4 (7)	6,0 ± 0,3 (25)	0,45
<sup>14</sup> C Testostérone (ng / follicule) <sup>3</sup>	49 ± 7	40 ± 3,4	0,19
<sup>14</sup> C E <sub>2</sub> -17β (ng / follicule) <sup>3</sup>	1,6 ± 0,1	2,3 ± 0,4	0,64
Estradiol-17β total (liq. foll.) (ng/ml)	200 ± 38	110 ± 18	0,10
Estradiol-17β total (M. de culture) (ng/ml/4h)	6 ± 0,6	3,2 ± 0,5	0,09

FS-NA 1 = Follicules subordonnés non atresiques les plus gros de stade I+III (absence de FD ou présence d'un seul FD, ce dernier étant atresique).

FS-NA 2 = Les autres follicules subordonnés non atresiques de stade I+III.

Estradiol-17β total = E<sub>2</sub>-17β + <sup>14</sup>C E<sub>2</sub>-17β.

<sup>1</sup> L'état du follicule est déterminé après culture.

<sup>2</sup> (n) = nombre de follicules.

<sup>3</sup> Production du stéroïde mesurée dans le volume total du liquide folliculaire plus le milieu de culture.

Tableau 22 Comparaison des stéroïdes du follicule subordonné (FS) histologiquement <sup>1</sup> non atresique le plus riche en estradiol-17 $\beta$  (liquide folliculaire) dans la paire d'ovaires avec ceux des autres FS non atresiques en absence d'un follicule dominant (FD) ou en presence d'un FD histologiquement atresique et physiologiquement inactif.

Paramètres	FS-NA 3	FS-NA 4	Probabilité
Diamètre (mm) (n) <sup>2</sup>	6,9 $\pm$ 0,6 (5)	6,0 $\pm$ 0,3 (26)	0,35
<sup>14</sup> C Testostérone (ng / follicule) <sup>3</sup>	49 $\pm$ 8	39 $\pm$ 3	0,21
<sup>14</sup> C E <sub>2</sub> -17 $\beta$ (ng / follicule) <sup>3</sup>	1,8 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,4	0,93
Estradiol-17 $\beta$ total (M. de culture) (ng/ml/4h)	8 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,3	0,03 *

FS-NA 3 = Follicules subordonnés non atresiques les plus riches en estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire de stade I+III (absence de FD ou presence d'un FD unique et histologiquement atresique).

FS-NA 4 = Les autres follicules subordonnés non atresiques de stade I+III.

Estradiol-17 $\beta$  total = E<sub>2</sub>-17 $\beta$  + <sup>14</sup>C E<sub>2</sub>-17 $\beta$ .

<sup>1</sup> L'état du follicule est déterminé après culture.

<sup>2</sup> (n) = nombre de follicules.

<sup>3</sup> Production du stéroïde mesurée dans le volume total.  
du liquide folliculaire plus le milieu de culture.

\* = Probabilité significative.

Tableau 23 Effets de la présence du follicule dominant (FD) sur la production des follicules subordonnés (FS) <sup>1</sup> non atrésiques en stéroïdes et la concentration de ces derniers en estradiol-17 $\beta$  total du liquide folliculaire et du milieu de culture.

Paramètres	FS-NA de stade I (absence de FD)	FS-NA du reste du cycle (présence de FD)	Probabilité
Diamètre (mm) (n) <sup>2</sup>	6,2 $\pm$ 0,2 (24)	7,4 $\pm$ 0,4 (16)	0,007 *
<sup>14</sup> C Testostérone (ng / follicule) <sup>3</sup>	43 $\pm$ 3,7	49 $\pm$ 5	0,41
<sup>14</sup> C E <sub>2</sub> -17 $\beta$ (ng / follicule) <sup>3</sup>	2 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,5	0,09
Estradiol-17 $\beta$ total (liq. foll.) (ng/ml)	115 $\pm$ 23	124 $\pm$ 30	0,71
Estradiol-17 $\beta$ total(M. de culture) (ng/ml/4h)	4 $\pm$ 0,6	9' $\pm$ 2,7	0,61

FS-NA = follicules subordonnés non atrésiques.

Estradiol-17 $\beta$  total = E<sub>2</sub>-17 $\beta$  + <sup>14</sup>C E<sub>2</sub>-17 $\beta$ .

<sup>1</sup> L'état du follicule est déterminé après culture.

<sup>2</sup> (n) = nombre de follicules.

<sup>3</sup> production du stéroïde mesurée dans le volume total.  
du liquide folliculaire plus le milieu de culture.

\* = Probabilité significative.

Tableau 24      Effet du début de l'atrésie sur la production en stéroïdes et la concentration en estradiol-17 $\beta$  total du liquide folliculaire et du milieu de culture des FS <sup>1</sup> des stades II+III+IV+V (périodes du cycle où au moins un follicule dominant (FD) est présent).

Paramètres	FS-NA de Stade II+III+IV+V	FS-A1 de stade II+III+IV+V	Probabilité
Diamètre (mm) (n) <sup>2</sup>	7,4 $\pm$ 0,4 (16)	6,8 $\pm$ 0,3 (29)	0,29
<sup>14</sup> C Testostérone (ng / follicule) <sup>3</sup>	49 $\pm$ 5	35 $\pm$ 2,5	0,05 *
<sup>14</sup> C E <sub>2</sub> -17 $\beta$ (ng / follicule) <sup>3</sup>	3 $\pm$ 0,5	2 $\pm$ 0,3	0,04 *
Estradiol-17 $\beta$ total (liq. foll.) (ng/ml)	124 $\pm$ 30	62 $\pm$ 30	0,07
Estradiol-17 $\beta$ total (M. de culture) (ng/ml/4h)	9 $\pm$ 2,7	1,7 $\pm$ 0,4	0,002 *

FS-NA = follicules subordonnés non atrésiques.

FS-A1 = follicules subordonnés en début de l'atrésie.

Estradiol-17 $\beta$  total = E<sub>2</sub>-17 $\beta$  + <sup>14</sup>C E<sub>2</sub>-17 $\beta$ .

<sup>1</sup> L'état du follicule est déterminé après culture.

<sup>2</sup> (n) = nombre de follicules.

<sup>3</sup> Production du stéroïde mesurée dans le volume total du liquide folliculaire plus le milieu de culture.

\* = Probabilité significative.

## 3.5 Discussion

### 3.5.1 Validation du modèle utilisant les ovaires d'abattoir pour l'étude de la hiérarchie folliculaire

L'originalité de ce travail de recherche est l'utilisation d'un modèle d'étude qui utilise les ovaires d'abattoir pour étudier la hiérarchie folliculaire au sein de la paire d'ovaires. Nous avons établi ce modèle à la lumière des travaux de Ireland et al. (1980) et nous l'avons décrit dans le tableau 12. Par comparaison au suivi des vaches par échographie, notre modèle d'ovaires d'abattoir présente l'avantage d'être moins coûteux et demande moins de temps. Ceci est particulièrement vrai lorsqu'il faut étudier un grand nombre de follicules de stade I par exemple. Ainsi, sur des ovaires d'abattoir nous avons bâti deux expériences complémentaires. La première nous a permis d'établir la hiérarchie folliculaire au sein de la paire d'ovaires par histologie sans que les follicules aient subi de culture; d'où l'avantage que présente cette expérience. Nous avons aussi étudié l'activité fonctionnelle des follicules en relation avec cette hiérarchie et ce, en examinant l'estradiol-17 $\beta$  et l'androstènedione du liquide folliculaire. Mais, avec cette première expérience nous n'avons pas pu suivre les activités de synthèse des stéroïdes ni la relâche d'estradiol-17 $\beta$  par les follicules *in vitro*. Par contre, nous avons pu étudier ces paramètres physiologiques en relation avec la hiérarchie folliculaire lors de la deuxième expérience et ce, après culture stationnaire des follicules pendant une courte durée, d'où l'avantage de cette deuxième expérience. Et ce, d'autant plus que nous avons trouvé que la culture des follicules n'affecte pas la structure histologique des cellules de la granulosa.



À partir des deux expériences que nous avons réalisées nous schématisons nos résultats dans la figure 14 qui illustre notre modèle de hiérarchie folliculaire. Ainsi, à l'exception du stade I, il existe toujours un FD sur la paire d'ovaires. Dans la littérature, plusieurs chercheurs ont étudié la dynamique du développement folliculaire par échographie chez la vache (Pierson et Ginther, 1987a; Knopf et al., 1989; Sirois et Fortune, 1988, 1990; Guilbault et al., 1991, 1992; Murphy et al., 1991; Ginther et al., 1989; Kastelic et al., 1990; Savio et al., 1988; Sunderland et al., 1994; Fortune, 1994). Ces chercheurs ont également démontré la présence de FD à n'importe quel moment du cycle à l'exception des jours 0, 1, 2 et 3. De plus, selon les études effectuées par échographie, il existe seulement une cohorte de follicules de taille moyenne pendant les jours 0, 1, 2 et 3 du cycle. Ces follicules sont en croissance qui est estimée à l'échographie par l'augmentation dans le temps de la taille du follicule. Nous avons émis l'hypothèse que ces follicules seraient non atrésiques. Nos résultats montrent qu'au stade I, la plupart des FS sont non atrésiques (figure 14). Notre détermination du stade I du cycle, basée sur l'apparence du corps jaune et l'absence de FD sur la paire d'ovaires correspond donc bien au début du cycle (jours 0, 1, 2, 3) décrit par échographie. Par ailleurs, certaines caractéristiques précises du corps jaune tel que décrit par Ireland et al. (1980) et par Sirard (communication personnelle) et la présence d'un seul FD sur la paire d'ovaires nous ont permis d'attribuer à ce genre de paire d'ovaires, le début avancé du cycle (stade II). Nos résultats montrent que le FD présent sur les ovaires assignés à cette période du cycle est histologiquement non atrésique (figure 14). Selon les études effectuées par échographie, entre les jours 4 et 8 du cycle, un seul gros follicule est présent sur la paire d'ovaires et ce follicule est en croissance (Pierson et Ginther, 1987a; Sirois et Fortune, 1988; Savio et al., 1988; Ginther et al., 1989; Knopf et al., 1989; 1990; Kastelic et al., 1990; Murphy et

al., 1991; Guilbault et al., 1991, 1992; Sunderland et al., 1994; Fortune, 1994). Nous avons émis l'hypothèse que ce gros follicule serait histologiquement non atrésique. Nos observations histologiques confirment donc cette hypothèse (figure 14). Notre attribution d'une paire d'ovaires à la période du début du cycle (jour 1 à 3) ou à celle des jours 4 à 8 du cycle est donc valable.

Par ailleurs, nos résultats montrent qu'au milieu du cycle, lorsqu'un FD unique est présent sur la paire d'ovaires (stade III), il est histologiquement atrésique alors que, lorsque deux FD sont présents (stade IV et V), l'un est histologiquement sain, l'autre atrésique (figure 14). Lorsqu'on examine le modèle de vagues folliculaires établies par échographie (Pierson et Ginther, 1987a; Savio et al., 1988; Knopf et al., 1989; Ginther et al., 1989; Sirois et Fortune, 1988, 1990; Kastelic et al., 1990; Murphy et al., 1991; Guilbault et al., 1991, 1992; Sunderland et al., 1994; Fortune, 1994), on voit qu'entre les jours 8 et 13 un seul FD est présent sur la paire d'ovaires et il est en régression à l'échographie. Vraisemblablement, il serait atrésique d'un point de vue histologique. Guilbault et al. (1993) et Fortune et al. (1994) ont montré que des FD en régression lors des observations par échographie étaient histologiquement atrésiques. Le FD atrésique que nous venons d'évoquer (au stade III) appartiendrait donc à des paires d'ovaires situées probablement entre les jours 8 et 13 du cycle estral. Par ailleurs, à partir du jour 13 il existe deux FD chez les vaches à 2 vagues (Pierson et Ginther, 1984; Kastelic et al., 1989; Knopf et al., 1989; Ginther et al., 1989b) et 2 FD à deux reprises chez les vaches à 3 vagues (Ireland et Roche, 1987; Savio et al., 1988; Sirois et Fortune, 1988). Nous précisons que dans la figure 14, nous n'avons schématisé que le cas des cycles de vaches à deux vagues de développement folliculaire. Dans les

deux cas (vaches à 2 ou 3 vagues), à l'échographie, l'un des FD est en croissance, l'autre en régression (Pierson et Ginther, 1984; Ireland et Roche, 1987; Savio et al., 1988; Sirois et Fortune, 1988, Kastelic et al., 1989; Knopf et al., 1989; Ginther et al., 1989b). Nos résultats suggèrent que vraisemblablement les FD observés en croissance par échographie, rapportés par la littérature, seraient histologiquement sains alors que les FD en décroissance par échographie seraient histologiquement atrésiques.

De plus, nous avons montré que le FD sain est plus riche en estradiol-17 $\beta$  dans le liquide folliculaire, synthétise plus de testostérone et relâche plus d'estradiol-17 $\beta$  *in vitro* que le FD atrésique. Ceci n'est pas surprenant vu que nous avons déjà démontré (section 2) que les paramètres biochimiques que nous venons de décrire sont plus élevées chez les gros follicules non atrésiques par comparaison aux gros follicules atrésiques (section 2.3). On pourrait dire, à partir de ces trois caractéristiques, que le FD non atrésique est physiologiquement actif et le FD atrésique est physiologiquement inactif. Nos résultats suggèrent alors que durant le cycle estral, le FD observé en croissance à l'échographie dans la littérature, serait histologiquement sain et physiologiquement actif alors que le FD en régression, observé à l'échographie, serait histologiquement atrésique et physiologiquement inactif. Ainsi, la similarité de nos résultats avec ceux de Guilbault et al. (1993) et Fortune et al. (1994) nous permet d'affirmer que notre attribution de tel moment du cycle à telle paire d'ovaires en fonction de l'apparence du corps jaune, de la présence du FD et de son état histologique était justifiée et donc notre modèle d'ovaires d'abattoir est valable. De plus, ce modèle nous permet d'avancer les connaissances apportées par les études des vagues folliculaire par échographie en confirmant l'hypothèse

concernant l'état histologique et physiologique des FD présents durant le cycle estral chez le bovin selon cette technique.

### **3.5.2 Influence de la présence et du statut du FD sur le taux d'atrésie des follicules subordonnés**

Nos résultats montrent que dans les paires d'ovaires non porteuses de FD (stade I) ou dans celles porteuses d'un FD unique, atrésique et physiologiquement inactif (stade III), la grande majorité des FS sont non atrésiques (figure 14). D'autre part, lorsqu'un seul FD non atrésique et physiologiquement actif est présent sur la paire d'ovaires (stade II), la plupart (environ 90 %) des FS sont atrésiques. Il en est de même pour les FS en présence de deux FD dont l'un est sain et physiologiquement actif et l'autre atrésique et physiologiquement inactif (stades IV et V) (figure 14). Nos résultats correspondent alors à la hiérarchie morphologique observée durant les vagues de croissance folliculaire observées par échographie à travers le cycle chez le bovin (Pierson et Guinther, 1987a; Savio et al., 1988; Knopf et al., 1989; Ginther et al., 1989; Sirois et Fortune, 1988, 1990; Kastelic et al., 1990; Murphy et al., 1991; Guilbault et al., 1991, 1992; Sunderland et al., 1994; Fortune, 1994). En effet, selon ces travaux, il y a un arrêt de croissance des follicules de la cohorte à chaque fois qu'un FD en croissance est présent sur la paire d'ovaires. Par contre, une cohorte de follicules subordonnés en croissance est identifiée lors de l'émergence de la première vague (jour 2) et de la deuxième vague folliculaires (jour 9 pour les vaches à 2 vagues et jour 11 pour les vaches à 3 vagues de développement folliculaire (Sirois et Fortune, 1988). L'échographie montre qu'au jour 2, il n'y a pas de gros follicule sur la paire d'ovaires alors qu'au jour 9 (vaches à 2 vagues) ou au jour 11 (vaches à 3 vagues) est présent un FD en régression. À

la suite des résultats obtenus à l'aide de l'échographie par ces chercheurs (Pierson et Guinther, 1987a; Savio et al., 1988; Knopf et al., 1989; Ginther et al., 1989; Sirois et Fortune, 1988, 1990; Kastelic et al., 1990; Murphy et al., 1991; Guilbault et al., 1991, 1992; Sunderland et al., 1994; Fortune, 1994), nous avons émis l'hypothèse qu'en présence d'un FD en régression, les FS en croissance seraient histologiquement sains. Par contre, en présence d'un FD en croissance les FS qui sont en régression ou en arrêt de croissance seraient histologiquement atrésiques. Nos résultats supportent donc ces hypothèses et confirment ceux de Rouillier et al. (1996) qui a montré que la présence d'un FD augmente le pourcentage d'atrésie des follicules de classe 2. Ils confirment aussi les résultats de Guilbault et al. (1993) qui ont montré que la proportion des follicules atrésiques de classe 2 (4,6 à 8,0 mm) est plus grande (64,4 %) durant la phase de croissance que pendant la phase de régression (40,7 %) du FD de première vague folliculaire suivie par échographie avant l'abattage des vaches. Toutefois, les critères utilisés par ces chercheurs pour classer les follicules selon leur état histologique sont différents des nôtres. En effet, ils considèrent qu'un follicule est atrésique s'il présente plus de 1 % de pycnoses dans les cellules de la granulosa, ce qui, selon nos critères, exclut les follicules en début de l'atrésie. Ceci justifie le plus grand taux d'atrésie des FS que nous avons obtenu dans les deux situations (présence de FD normal ou de FD atrésique), par rapport aux leurs. En ce qui concerne nos critères de l'atrésie, nous avons profité des résultats que nous avons obtenu dans le présent chapitre pour vérifier la fiabilité de nos critères du début de l'atrésie. Nos résultats montrent alors que les follicules subordonnés non atrésiques de stade II + III + IV + V synthétisent plus de testostérone et relâchent plus d'estradiol-17 $\beta$  *in vitro* que les follicules subordonnés en début de l'atrésie de même stade du cycle. Nous voyons alors que dans l'ensemble, nous retrouvons les

résultats que nous avons obtenus lors de l'étude du début de l'atrésie folliculaire (chapitre 2) entre les follicules non atrésiques et ceux qui sont en début de l'atrésie. Nous concluons de nouveau que nos critères histologiques du début de l'atrésie sont fiables. Ceci, même si nous n'avons pas pu le vérifier sur tous les stades du cycle séparément parce que nous étions limités par la taille de la population des FS. Toutefois, nous avons trouvé que les follicules subordonnés non atrésiques de stade I (tableau 23) sont similaires aux follicules subordonnés non atrésiques du reste du cycle, pour toutes les caractéristiques physiologiques étudiées. Précisons que ces deux types de follicules subordonnés non atrésiques proviennent des paires d'ovaires dont la situation n'est pas la même à travers le cycle, dans le sens où le follicule dominant n'est pas toujours présent. Aussi l'environnement hormonal n'est pas le même (Hansel et Convey, 1983). Mais ces paramètres ne semblent pas influencer les follicules subordonnés non atrésiques au sein de l'ovaire. Et il est fort possible qu'il en soit de même pour les follicules subordonnés débutant l'atrésie. En conclusion, vu que nos critères de détermination du début de l'atrésie sont plus rigoureux que ceux décrits dans la littérature, ils nous ont permis de caractériser la hiérarchie folliculaire de façon très rigoureuse au sein de la paire d'ovaires.

### **3.5.3 Influence de la présence et du statut du FD sur les caractéristiques physiologiques des follicules subordonnés**

Nos résultats montrent (Tableau 20) que les FS de stade I (début du cycle en absence de FD) et ceux de stade III (milieu du cycle en présence d'un FD unique et atrésique), présentent le même patron de synthèse folliculaire de testostérone, de contenu du liquide folliculaire et de

relâche dans le milieu d'incubation en estradiol-17 $\beta$ . Toutes ces caractéristiques physiologiques de ces FS sont par contre supérieures à celles des FS de stade II (début du cycle en présence d'un FD non atrésique). Nos résultats correspondent de nouveau à la hiérarchie morphologique observée durant les vagues de croissance folliculaire suivies par échographie (Pierson et Guinther, 1987a; Knopf et al., 1989; Sirois et Fortune, 1988, 1990; Guilbault et al., 1991, 1992; Murphy et al., 1991; Ginther et al., 1989; Kastelic et al., 1990; Savio et al., 1988; Sunderland et al., 1994; Fortune, 1994).

Nous nous attendions à ce que la synthèse d'estradiol-17 $\beta$  par les FS suive aussi le même patron que celui des autres paramètres étudiés. Mais, ce n'est pas le cas, ceci n'est pas surprenant vu que la population des FS étudiée est composée en majeure partie de follicules de moyenne taille (5 à 8 mm). Or, selon nos travaux de recherche sur l'atrésie (chapitre 2) nous n'avons pas trouvé de différence de synthèse d'estradiol-17 $\beta$  entre les follicules non atrésiques et atrésiques de moyenne taille. Malgré cela, nos résultats sont en accord avec ceux de Rouillier et al. (1996) qui a montré que le FD influence la fonction stéroïdienne des follicules. Ce chercheur a aussi démontré que l'effet du FD au troisième jour de traitement surovulatoire était aussi détecté pour les gros follicules atrésiques. En effet, la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation par les gros follicules atrésiques provenant de vaches porteuses était plus faible que celle des follicules provenant des vaches non porteuses d'un FD. Nos résultats confirment aussi ceux de Guilbault et al. (1992) qui ont montré que la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation des FS de classe 2 (4,6 à 8,0 mm) est plus grande durant la phase de régression du FD que pendant sa phase de croissance. Mais, les travaux de Rouillier et al. (1996) et de Guilbault et

al. (1992) que nous venons d'évoquer, étaient restreintes à l'examen de la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation. Ces travaux n'incluaient pas non plus les FS des jours 0, 1, 2 et 3 du cycle (stade I, absence de FD). Nos résultats s'accordent aussi avec les travaux de Fortune (1994) et Sunderland et al. (1994) concernant le statut physiologique des follicules de première vague folliculaire au jour 3 (absence de FD) (Sunderland et al., 1994; Fortune, 1994), au jour 6 (Sunderland et al. (1994)) ou au jour 7 (Fortune (1994)) (présence d'un FD en croissance) et au jour 11 (Fortune (1994)) ou au jour 12 (Sunderland et al. (1994)) (présence d'un FD en régression). L'étude de Fortune (1994) portait sur le contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  et en androstènedione des FS et FD respectivement, mais, était réalisée sur 4 vaches seulement, autrement dit, 4 paires d'ovaires. De plus, la comparaison d'estradiol-17 $\beta$  et d'androstènedione qu'elle a faite entre les jours étudiés concernait tous les follicules pris à ces jours du cycle. Autrement dit, les FS et les FD étaient confondus, ce qui ne fournit pas d'évidence propre aux FS. L'étude de Sunderland et al. (1994) portait sur l'activité estrogène (définie par le rapport molaire estradiol/progestérone) des FS et du FD séparément. Mais, selon nos résultats présentés dans le chapitre 2, ce rapport molaire, n'est pas un bon critère d'activité physiologique pour les follicules de taille moyenne.

Notre étude apporte donc plus de connaissances sur les caractéristiques histologiques et fonctionnelles que celles de Guilbault et al. (1992), Fortune (1994) et Sunderland et al. (1994). En effet, nous démontrons qu'en absence de FD sur la paire d'ovaires, les FS sont non atrésiques et physiologiquement actifs par la synthèse folliculaire de testostérone, le contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  et sa relâche dans le milieu d'incubation. Il en est de même lorsque la



paire d'ovaires renferme un FD atrésique et physiologiquement inactif. Par contre la présence d'un FD sain et physiologiquement actif est concomitante avec celle des FS atrésiques et physiologiquement inactifs sur la paire d'ovaires.

Nos résultats nous incitent à réfléchir à cet effet inhibiteur du FD sur la croissance des follicules plus petits présents sur la paire d'ovaires. On se demande alors comment le FD non atrésique et physiologiquement actif parvient il à inhiber la physiologie des follicules subordonnés. Il y a plusieurs possibilités par lesquelles le FD peut exercer sa dominance, soit par voie systémique ou intragonadique (Fortune et al., 1988). Actuellement, il y a des évidences concernant les effets physiologiques du liquide folliculaire du FD sur la suppression de croissance et de maturation des autres follicules (Cahill 1984; Miller et al., 1979). Il y a aussi des évidences sur la suppression de la réponse de ces follicules aux gonadotropines (Kling et al., 1984; DiZerega et al., 1982; 1983; Montz et al. 1984; Ono et al. 1986), sur l'inhibition de la liaison de FSH à son récepteur (Reichert et al., 1979; Fletcher et al., 1982; Nandedkar et al., 1992; bovin: Sluss et al., 1983; 1984) et sur le contrôle de secretion de FSH par le liquide folliculaire (Ireland et al., 1983). La sécrétion de FSH semble être contrôlée par l'action synergique de l'estradiol-17 $\beta$  et de l'inhibine sur l'hypophyse antérieure (Martin et al., 1988; Mann et al., 1992; Campbell et al., 1990; Wrathall et al., 1990; Baird et al., 1991; Lussier et Carruthers, 1989). Le follicule dominant présent sur la paire d'ovaires étant riche en inhibine (de Jong et Sharpe, 1976; Welschen et al., 1977; Scott et al., 1980; Henderson et Franchimont, 1981; Tsonis et al., 1983; Guilbault *et al.*, 1993; Ireland et al., 1994; Ireland et Ireland, 1994), serait la

source majeure de l'inhibine circulante. De plus, le FD est riche en estradiol-17 $\beta$  pendant sa dominance fonctionnelle (Turzillo et Fortune, 1992). En outre, l'estradiol-17 $\beta$  peut avoir des effets inhibiteurs directs dans les follicules de plusieurs espèces (Zelevnik, 1981; Hutz, 1989); il semble être un régulateur de la stéroïdogénèse folliculaire (Fortune, 1986, 1988; Fortune et Hansel, 1979). On pourrait donc penser que le FD inhibe le développement des follicules subordonnés par effet systémique ou paracrine via l'inhibine et/ou l'estradiol-17 $\beta$  du FD.

Par ailleurs le follicule dominant fonctionnel présenterait, dans son liquide folliculaire, de grandes teneurs de FSH par rapport aux follicules plus petits (McNatty et al., 1981) et de grandes quantités de IGF-1 (Hammond et al., 1992; Driancourt, 1991). Il a été montré que IGF-1 présente un rôle important dans la folliculogénèse (Ling et al., 1992) et dans le contrôle de la dominance folliculaire (Driancourt, 1991). Avec IGF1, il existe une famille de protéines de liaison de IGF-1 (BPS) qui peuvent moduler les actions de IGF-1 (Ling et al., 1992; Samaras et Hammond, 1992). Le facteur de croissance IGF-1 et son ARNm augmentent avec la croissance et le développement du follicule alors que les niveaux de IGFBP<sub>2</sub> et son ARNm diminuent (porc: Hammond et al., 1992). De même ces auteurs suggèrent que la réduction d'expression de IGFBP<sub>4</sub> et BP<sub>5</sub> pourrait servir à promouvoir sa croissance et son ovulation ultérieure. L'expression en IGFBP<sub>2</sub>, BP<sub>4</sub> et BP<sub>5</sub> du follicule dominant fonctionnel est réduite (Hammond et al., 1992). Il est alors possible que les follicules subordonnés qui, après la sélection du FD, se trouvant dans un environnement appauvri en FSH (Driancourt, 1991), expriment plus de IGFBP<sub>4</sub> et BP<sub>5</sub> et moins de IGF-1. Dans ce cas, ce serait là le facteur à l'origine de la baisse de synthèse de testostérone, du contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  et de sa relâche *in vitro* chez

ces follicules. Si c'est le cas, ce serait là l'une des voies par lesquelles le FD inhiberait la croissance des follicules subordonnés. Il est possible également qu'il existe une action paracrine exercée par le FD directement sur les follicules subordonnés en y induisant la synthèse des IGFBP<sub>4</sub> et BP<sub>5</sub>. D'ailleurs, ces protéines de liaison de IGF-1 ont été démontrées dans le liquide folliculaire de bovin (de la Sota et al., 1995).

### **3.5.4 Sélection du futur follicule dominant**

Il est connu dans la littérature que les follicules sont recrutés par cohorte et la sélection est le processus physiologique par lequel l'excès de follicules est réduit afin d'atteindre le quota ovulatoire caractéristique de l'espèce (Goodman et Hodgen, 1983; Saumande, 1991; Fortune, 1994). Mais les facteurs impliqués dans le phénomène de la sélection du follicule dominant demeurent encore obscurs. Le temps de la sélection est défini chez le bovin par les mesures effectuées par échographie (Savio et al., 1988; Sirois et Fortune, 1988; Pierson et Ginther, 1988a; 1988b) et les rapports molaires intra-folliculaires estradiol-17 $\beta$  sur progestérone (Ireland et Roche 1982, 1983a,b) comme le moment où un follicule estrogène actif favorise sa propre croissance et inhibe celle des autres follicules.

Nos résultats montrent que dans la cohorte des follicules recrutés non atrésiques est présent un follicule qui est plus estrogénique que les autres follicules subordonnés, par son contenu du liquide folliculaire et sa relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation. Dans la population des FS non atrésiques que nous avons étudiée, nous voulions faire une analyse statistique en

utilisant un test qui vise à détecter les valeurs aberrantes. Ce test devraient être pratiqué sur la teneur d'estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire des FS non atrésiques de chaque paire d'ovaires. Or, l'effectif de ces FS (4 follicules non atrésiques en moyenne par paire d'ovaires) n'était pas suffisant pour détecter des valeurs aberrantes par ce test. D'ailleurs, même si c'est le cas, nous ne pouvons pas savoir si cette valeur aberrante est associée à un artéfact de dosage par RIA (erreur expérimentale) ou à un phénomène physiologique qui s'est produit uniquement dans un follicule et pas dans les autres (Charuest, communication personnelle). De ce fait, et comme nous cherchons à identifier un follicule parmi la cohorte des FS non atrésiques qui à peine commence à se démarquer par rapport aux autres par son contenu d'estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire, nous l'avons repéré dans chaque paire d'ovaires pour le comparer au reste des FS non atrésiques de la cohorte en utilisant d'autres paramètres physiologiques dont la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation. Cette relâche s'avère 3 fois significativement plus importante pour ce follicule que pour le restant des FS non atrésiques de la cohorte. D'autre part, ce follicule n'est pas le plus gros de la cohorte. Mais il pourrait être le futur follicule dominant. Ainsi le contenu d'estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire et la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation pourraient être parmi les facteurs nous permettant d'identifier le follicule sélectionné ou en voie de l'être. À notre connaissance, Sunderland et al. (1994) et Adams (1994) sont les seuls chercheurs qui se sont intéressés entre autres à explorer quelques facteurs qui pourraient être impliqués dans le phénomène de la sélection du follicule dominant. Adams (1994) a rapporté qu'il était capable de prédire à l'aide de l'échographie quel est le futur FD parmi la cohorte des FS en croissance. Le critère de cet auteur est la taille de ce follicule. Mais nos résultats ne supportent pas cette affirmation. Nos résultats sont par contre en accord avec ceux de

Sunderland et al.. (1994) qui ont aussi rapporté que le follicule dominant n'est pas toujours le plus gros durant la phase de la sélection (jours 1 et 2). Ils rajoutent que l'estradiol du liquide folliculaire et le rapport molaire estradiol / progestérone ne sont pas différents pour tous les follicules  $\geq 5$  mm au jour 1 après l'ovulation alors que la concentration de progestérone est plus grande chez les follicules  $F_2$  (deuxième plus gros follicule de la paire d'ovaires) et  $F_3$  (les autres follicules de la paire d'ovaire) que chez les follicules  $F_1$  (follicule le plus gros de la paire d'ovaire). Ces auteurs suggèrent de ce fait, que la progestérone pourrait être un facteur important pour établir quel follicule va devenir dominant durant la phase de la sélection.

Cependant, la conclusion de ces chercheurs devrait être prise aussi avec prudence puisqu'ils ignorent l'état histologique de ces follicules. Il n'est donc pas surprenant qu'ils ne trouvent pas de différences d' estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire entre les follicules  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$  au jour 1 puisque la cohorte folliculaire à ce jour renferme également des follicules atresiques. Ces derniers ont un liquide folliculaire faiblement concentré en estradiol-17 $\beta$ . Il est vrai, d'après nos résultats, qu'à ces jours la grande majorité des follicules sont non atresiques, mais n'oublions pas que la concentration en estradiol-17 $\beta$  des follicules sains de moyenne taille n'est pas très importante puisque l'activité de leur enzyme d'aromatisation n'est pas très grande (McNatty et al., 1984a). De plus, le fait de confondre les follicules sains avec les atresiques camouflerait la différence en estradiol-17 $\beta$  entre les follicules  $F_1$ ,  $F_2$  et  $F_3$ . D'autre part, il est possible que la plus grande concentration de progestérone qu'ils ont trouvée chez les follicules  $F_1$  soit associée à l'atresie de ces follicules plutôt qu'à leur sélection.

En ce qui concerne la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation, nous sommes les premiers chercheurs à considérer ce paramètre pour étudier le phénomène de la sélection du follicule dominant. Il est très intéressant de remarquer que le follicule subordonné non atrésique le plus estrogénique (par son contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$ ) relâche significativement près de trois fois plus d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation que les autres follicules subordonnés également non atrésiques. Nous ne savons pas par quel mécanisme au niveau du follicule cela pourrait se produire. Mais il est intéressant de remarquer que lors de nos études portant sur l'atrésie folliculaire (chapitre 2) nous avons démontré qu'une diminution importante de relâche d'estradiol-17 $\beta$  *in vitro* est associée avec l'apparition des premiers signes morphologiques de l'atrésie folliculaire. Maintenant nous observons une augmentation de cette relâche d'estradiol-17 $\beta$  associée avec la sélection du follicule dominant. Tout se passe comme si les mécanismes qui régissent la sélection du follicule dominant et le début de l'atrésie étaient les mêmes mais, s'effectuent de façon inversée selon le cas (sélection ou début de l'atrésie). Il serait donc intéressant d'orienter la recherche dans cette voie.

Par ailleurs il a été démontré que la période de la sélection, jours 1 à 3 et jours 10 à 12 (Sunderland et al., 1994) ou l'émergence de chaque vague folliculaire (Adams et al., 1992) est précédée par une augmentation du niveau sérique de la FSH (Sunderland et al., 1994; Adams et al., 1992). La FSH a un rôle déterminant à tous les stades de développement folliculaire (Richards, 1980). Tout se passe comme si l'augmentation de la concentration de la FSH circulante initie la phase d'émergence et de croissance du follicule dominant. Cette hypothèse est

confirmée par les résultats d'Adams et al. (1992) qui démontrent que l'administration de liquide folliculaire bovin retarde l'augmentation sérique de la FSH après l'ovulation entre les jours 0 et 3 du cycle. Ce délai dans l'augmentation de la FSH circulante retarde l'émergence d'un nouveau follicule dominant. Turzillo et Fortune (1990) ainsi que Lussier et al. (1994) ont aussi démontré que l'injection de liquide folliculaire bovin provoque une baisse de la concentration circulante de la FSH et empêche le recrutement et donc il n'y a pas de sélection. En accord avec les résultats d'Adams et al. (1992), de Turzillo et Fortune (1990), et de Lussier et al. (1994), Sunderland et al. (1994) démontrent le modèle de sécrétion cyclique de la FSH durant le cycle estral chez le bovin et suggèrent que cette sécrétion de FSH est responsable de l'émergence et de la sélection du follicule dominant qui, une fois sélectionné, exerce un rétro-contrôle négatif sur la concentration sérique de la FSH par son estradiol-17 $\beta$  (Price et Webb, 1988) et son inhibine (Beard et al., 1990; Rivier et Vale, 1991; Robertson et al., 1991). Ces évidences nous incitent à penser que c'est la FSH qui serait responsable de l'augmentation que nous avons trouvée concernant la relâche d'estradiol-17 $\beta$  *in vitro* d'un seul follicule parmi la cohorte. Mais nous ne savons toujours pas pourquoi un seul de ces follicules est sélectionné.

Dans une étude, conçue pour explorer le phénomène de la sélection folliculaire chez le rat, Ling et al. (1992) ont démontré avec les cellules de la granulosa en culture que les faibles niveaux de FSH (<5 ng/ml) dans le milieu de culture stimulent la production de IGFBP (protéine de liaison de IGF-1), et que des hauts niveaux de FSH (>25 ng/ml) inhibent la production de IGFBP<sub>4</sub> et BP<sub>5</sub>. Ces protéines de liaison de IGF-1 sont connues pour leur effet modulateur des actions de IGF-1 (Ling et al., 1992; Samaras et Hammond, 1992) et IGF-1 joue un rôle critique

dans le phénomène normal de croissance et de différenciation du follicule préovulatoire (Ling et al., 1992; Driancourt, 1991). Ling al. (1992) concluent de ce fait, que l'expression régulée de IGFBP<sub>4</sub> et BP<sub>5</sub> pourrait être le mécanisme par lequel s'effectue la sélection du follicule dominant chez le rat. Il est possible qu'il en soit de même pour le bovin mais nous ne savons pas encore si les IGFBP<sub>4</sub> et BP<sub>5</sub> qui sont démontrés dans les follicules de porc (Grimes et al., 1992) et de rat (Ling et al., 1992) sont aussi présents dans le follicule bovin. Si c'est le cas, la mesure de la production de IGFBP<sub>4</sub> et BP<sub>5</sub> pourrait être un bon paramètre d'étude pour élucider le ou les mécanismes de la sélection du follicule dominant chez le bovin.



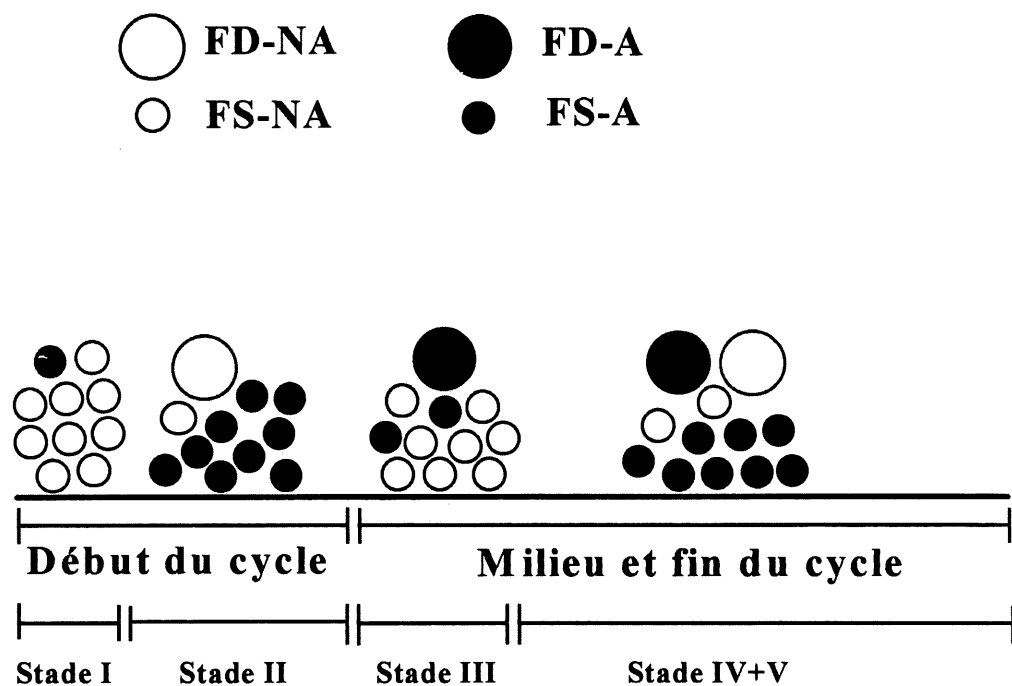


Figure 14 Modèle de hiérarchie folliculaire dans l'ovaire de bovin durant le cycle estral.

FS-A= Follicules subordonnés atrésiques.  
 FS-NA= Follicules subordonnés non atrésiques.  
 FD-A= Follicules dominants atrésiques.  
 FD-NA= Follicules dominants non atrésiques.

## 4. Conclusion

1- L'évaluation de l'état histologiquement non atrésique du follicule bovin lorsque le nombre de pycnoses par section folliculaire ne dépasse pas 5 est un critère fiable. Le début de l'atrésie est caractérisé sur le plan morphologique par la présence de 10 à 25 pycnoses par section folliculaire. Nous avons également noté dans la section folliculaire, la présence de 25 à 30 cellules qui ressemblent aux pycnoses. Nous avons nommé ces cellules des prépycnoses. Mais nous n'avons aucune évidence que ces cellules deviendront pycnotiques. Sur le plan physiologique le début de l'atrésie est caractérisé, chez les follicules de grande taille seulement par une diminution significative des deux rapports molaires  $E_2/A$  et  $E_2/P_4$ . De plus, l'activité estrogène définie par le rapport molaire  $E_2/A > 1$  est un bon indicateur du début de l'atrésie chez les gros follicules. Il en est de même pour l'activité estrogène définie par le rapport molaire  $E_2/P_4 > 0,1$ . Le début de l'atrésie est également marqué chez les gros follicules seulement par une baisse de synthèse *in vitro* de testostérone (dans nos conditions de culture). Par contre chez les deux classes folliculaires le début de l'atrésie est caractérisé par une chute draconienne de relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation (d'environ 50 % chez les moyens et de 90 % chez les gros follicules). Il existe alors des variations physiologiques importantes reliées au tout début de l'atrésie. Ceci témoigne de la validité de nos critères histologiques d'identification du début de l'atrésie folliculaire.

2- Notre modèle d'étude de la hiérarchie folliculaire au sein de la paire d'ovaires à partir d'ovaires d'abattoir est un modèle tout à fait valable. Les stades du cycle sont déterminés par l'apparence du corps jaune et la présence ou non de FD sur la paire d'ovaires. Ce modèle nous a permis de confirmer la hiérarchie morphologique observée dans la littérature lors des études des vagues folliculaires par échographie. De plus, il nous a permis d'avancer nos connaissances dans ce contexte. En effet, nous avons démontré que la présence d'un FD non atrésique et physiologiquement actif (par la synthèse folliculaire de testostérone *in vitro* et la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation) sur la paire d'ovaires est concomitante avec un taux élevé de follicules atrésiques et physiologiquement inactifs (par les mêmes critères que ceux des FD) parmi les FS. Inversement, lorsqu'un FD atrésique et physiologiquement inactif est présent sur la paire d'ovaires ou lorsque cette dernière est dépourvue de FD, la plupart des FS sont non atrésiques et physiologiquement actifs. Autrement dit, la morphologie et l'activité physiologique des FS sont influencées par la présence et le statut histologique et physiologique du FD. Enfin, dans la cohorte des FS non atrésiques recrutés, est présent un follicule non atrésique qui est significativement le plus riche, dans la cohorte des FS, en estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire; il n'est pas le plus gros. Sa relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation est près de 3 fois significativement plus élevée que celle des autres FS non atrésiques de la cohorte. Ce FS pourrait être le futur FD de la paire d'ovaires. Ainsi, l'augmentation de la relâche *in vitro* d'estradiol-17 $\beta$  pourrait être le ou l'un des facteurs indiquant la sélection du futur FD.

3-Nous avons alors démontré entre autres, que le début de l'atrésie est caractérisé par une baisse importante de relâche *in vitro* d'estradiol-17 $\beta$  par les follicules des deux classes de taille.

Inversement, la sélection du FD est marquée par une augmentation importante de cette relâche. En élucidant dans l'avenir le ou les mécanismes qui régissent cette relâche, nous arriverons sûrement à mieux comprendre les facteurs qui influencent la maturation des follicules. Ceci nous permettrait d'améliorer les techniques qui visent à optimiser la fertilité des bovins et donc d'améliorer la réponse des vaches au traitement de suroovulation. Ce qui serait bénéfique pour l'industrie du transfert d'embryons.

## **5. Annexe: étude des conditons optimales de stimulation des follicules bovins en culture de longue durée**

L'objectif de recherche dans ces travaux est de mettre au point un système de culture de follicules bovins dans des conditions optimales de stimulation. Ce système nous permettrait de démontrer *in vitro* l'existence d'un effet inhibiteur paracrine exercé par le FD sur la croissance des autres follicules présents sur la paire d'ovaires. Pour ce faire nous avons réalisé une série d'expériences dont nous allons présenter les principaux résultats et conclusions.

Dans un premier temps, nous avons mis au point une technique d'histologie utilisant des frottis cellulaires dans la granulosa. Les frottis cellulaires sont fixés dans un mélange de méthanol, formaldéhyde et acide acétique. Les frottis fixés ont ensuite subi une coloration de Feulgen suivie d'une déshydratation et d'un éclaircissement avant d'être montés entre lame et lamelle. Cette technique, validée par comparaison à la technique d'histologie classique (Martin, 1986), est tout à fait valable pour des follicules sans culture. De plus, elle présente l'avantage d'être simple et rapide.

Nous avons alors réalisé une première expérience en nous basant sur des résultats précédemment obtenus dans notre laboratoire. Ces résultats montrent que le système de culture en périfusion semble être apte au maintien de l'état physiologique des follicules pendant une période de vingt-cinq heures. Mais aucune différence significative n'a été décelée après traitement

de ces derniers par FSH (0 ng/ml, 100 ng/ml, 400 ng/ml, 1000 ng/ml) quant à la relâche d'estradiol dans le milieu de culture. De plus, après 25 heures d'incubation, il a été noté que la relâche en estradiol-17 $\beta$  a tendance à diminuer et que celle de l'androstènedione subit une chute abrupte. l'une des hypothèses était que cette baisse de la teneur en androstènedione pourrait être à l'origine de celle d'estradiol-17 $\beta$  par manque de substrat.

Nous avons alors réalisé une expérience où nous avons mis en culture de périfusion des follicules de 7 à 8 mm de diamètre. La durée de la culture était de 25 heures. Nous avons supplémenté le milieu d'incubation soit avec de l'androstènedione  $10^{-7}$  M, soit avec de la FSH 10 ng/ml ou 100 ng/ml, soit avec un traitement combiné d'androstènedione avec la FSH (10 ou 100 ng/ml). Le groupe témoin n'avait reçu ni androstènedione ni FSH dans le milieu de culture. Au terme de l'incubation, l'état du follicule a été déterminé en utilisant la technique des frottis cellulaires. Les résultats montrent un changement de l'état physique du follicule après 25 heures de culture (le follicule devient mou). L'état n'a pas d'effet sur la concentration d'estradiol-17 $\beta$  du liquide folliculaire ni sur sa relâche dans le milieu d'incubation, ce qui va à l'encontre de toutes les données de la littérature. On ne semblait donc pas bien discriminer l'état du follicule après 25 heures de culture en utilisant la technique des frottis cellulaires. De plus, nous n'avons pas trouvé d'effet de FSH (0 ou 10 ng/ml) sur la relâche d'estradiol-17 $\beta$  dans le milieu d'incubation. Mais, le traitement du milieu à 10 ng/ml de FSH avait tendance à favoriser la relâche d'estradiol-17 $\beta$  par comparaison au traitement de 100 ng/ml. Le traitement du milieu avec  $10^{-7}$  M d'androstènedione inhibait la relâche d'estradiol-17 $\beta$  à 25 heures de culture par comparaison aux témoins et ce, quel

que soit l'état du follicule. Nous avons trouvé aussi une diminution de relâche d'estradiol-17 $\beta$  après 25 heures de culture et ce, quel que soit l'état et le traitement du milieu.

À la suite de ces résultats, nous avons repris l'expérience avec la même hypothèse de travail voulant qu'en présence d'androstènedione dans le milieu d'incubation, les follicules stimulés par FSH maintiennent un taux élevé de relâche d'estradiol-17 $\beta$  après 25 heures de culture. Nous avons alors supplémenté le milieu d'incubation, soit avec de l'androstènedione  $10^{-7}$  M, soit avec de la FSH 10 ng/ml, soit avec les deux. Le groupe témoin n'avait reçu ni androstènedione ni FSH dans le milieu de culture. Au terme de l'incubation, nous avons évalué l'état du follicule après histologie classique (Martin, 1986). Les résultats montrent de nouveau un changement de l'état physique du follicule qui devient mou après 25 heures d'incubation. Quel que soit le traitement, le contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  et sa relâche dans le milieu d'incubation étaient supérieurs chez les follicules normaux que chez les follicules atresiques. Il n'y avait pas d'effet de FSH ni d'androstènedione sur le contenu du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  ni sur sa relâche dans le milieu d'incubation et ce, quel que soit l'état du follicule. Nous avons de nouveau obtenu une baisse de relâche d'estradiol-17 $\beta$  après 25 heures de culture et ce, quel que soit l'état du follicule et le traitement du milieu d'incubation. Notre hypothèse n'était donc pas vérifiée.

Dans une autre étude, nous avons examiné la structure des cellules de la granulosa après 25 heures de culture en perfusion, en culture stationnaire à court terme (3, 4 ou 6 heures) ou sans culture de follicules et ce, sous différentes conditions histologiques. Les résultats indiquent que

les cellules de la granulosa de follicules incubés 25 heures montrent des signes de dégénérescence, contrairement aux cellules de la granulosa de follicules non incubés ou incubés à courte durée.

Nous avons alors réalisé une autre étude pour vérifier si des cellules de la granulosa en dégénérescence continuent à avoir une activité de synthèse hormonale *in vitro*. Pour cela les follicules ont été mis en culture pendant 25 heures. Durant les premières 21 heures de cultures de périfusion, les follicules ont reçu dans leur milieu de culture, soit de l'androstènedione ( $4,36 \times 10^{-7}$  M), soit de la FSH (2 ng/ml), soit un traitement combiné des deux hormones. Les follicules du groupe témoin n'ont reçu ni androstènedione ni FSH. Ensuite tous les follicules ont été transférés dans un système de culture stationnaire pendant 4 heures en présence de  $^{14}\text{C}$  androstènedione à  $4,36 \times 10^{-7}$  M et de FSH à 2 ng/ml. Au terme de l'incubation les follicules ont subi la technique d'histologie classique. Les résultats montrent de nouveau un changement de l'état physique du follicule qui devient mou après 21 heures et 25 heures de culture. Quel que soit le traitement, la teneur du liquide folliculaire en estradiol-17 $\beta$  et sa relâche dans le milieu d'incubation sont supérieures chez les follicules normaux que chez les follicules atrophiques. La synthèse de testostérone par les follicules normaux est supérieure à celle des follicules atrophiques. Quel que soit l'état folliculaire, cette synthèse est de l'ordre de 8 % de celle mesurée dans le cas des follicules mis en culture stationnaire de courte durée (4 heures). Il n'y a pas d'effet de FSH pour tous les paramètres physiologiques étudiés. L'androstènedione ( $4,36 \times 10^{-7}$  M) est inhibiteur en culture de longue durée (21 heures par comparaison à 1 heure et demie). Nous observons de nouveau une diminution de relâche d'estradiol-17 $\beta$  après 21 heures et 25 heures de culture. Cette



diminution serait donc probablement liée à la dégénérescence des cellules de la granulosa après culture de longue durée.

De toutes ces études, nous concluons que nous n'avons pas encore réussi à établir des conditions optimales de stimulation des follicules bovins en culture de longue durée. Nous ne sommes de ce fait pas encore en mesure d'étudier la dominance folliculaire *in vitro*.

## 6. Bibliographie

ABOUL FADLE, W.S., M.F.A. FAHMY et S.M. EL SHAFEY. 1974. Histological studies on the follicles with special reference to their atresia in Egyptian Buffaloes. *zbl. Vet. Med. A* 21: 660-670.

ADAMS, G.P., R.L. MATTERI, J.P. KASTELIC, J.C.H. KO et O.J. GINTHER. 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fert.* 94: 177-188.

ADAMS, G.P.. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications of synchronization and superstimulation. *Theriogenology* 41: 19-24.

ADELAKOUN, V., P. MATTON, J.J. DUFOUR et Y. COUTURE. 1977. Development of the ovarian follicles in the cow. *Soc. Study. Reproduct. 10th Annual Meeting, Texas* p.66. Abstr. 109.

BAIRD, D.T., B.K. CAMPBELL, G.E. MANN et McNEILLY. 1991. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep (Review). *J. Reprod. Fert. suppl.* 43: 125-138.

BEARD, A.J., R.J. CASTILLO, B.J. McLEOD, R.G. GLENCROSS et PG KNIGHT. 1990. Comparison of the effects of crude and highly purified bovine inhibin (M<sub>r</sub> 32000) on plasma concentrations of FSH and LH in chronocally ovariectomized prepubertalheifers. *J. Endocrino.* 125: 21-30.

BEAULIEU, E.E.. 1984. Pharmacology of steroid receptors: from molecular and cellular studies to efficient antihormonal drugs. *Biochem. pharma.* 33: 905-912.

BHERER, J., J. DUFOUR et P. MATTON. 1976. Destinée des deux plus gros follicules des ovaires de brebis à la suite de la destruction des plus gros follicules et/ou de l'enlèvement du corps jaune à deux moments du cycle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 54: 7-11.

BUKOVSKY, A. I. TREBICHAUSKY, J. PRESL et J. ZIDOVSKY. 1978. Sub-microscopic evidence of lymphoid cells within the granulosa of the rat atretic follicle. *IRCS Med. Sci. Libr. Compend.* 6: 80.

CAHILL, L.P., I.J. CLARKE, J.T. CUMMINS, M.A. DRIANCOURT, R.S. CARSON et J.K. FINDLAY. 1984. An inhibitory action at the ovarian level of ovine follicular fluid on PMSG-induced folliculogenesis in hypophysectomized ewes. In: Proceedings of the 5th ovarian workshop, pp. 35-38. Eds D.O. Toff and R.J. Ryan. Ovarian Workshops, Champaign, Illinois.

CAHILL, L.P., J.C. MARIANA et P. MAULEON. 1979. Total follicular population in ewe of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fert.* 55: 27-36.

CAMPBELL, B.K., G.E. MANN, A.S. McNEILLY et D.T. BAIRD. 1990. The pattern of ovarian inhibin, Estradiol and androstenedione secretion during the estrous cycle of the ewe. *Endocrinology* 127: 227-235.

CARSON, R.S., J.K. FINDLAY, H.G. BURGER et A.O. TROUNSON. 1979. Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol. Reprod.* 21: 75-87.

CARSON, R.S., J.K. FINDLAY, I.J. CLARCKE et H.G. BURGER. 1981. Estradiol, testosterone and androstenedione in ovine follicular fluid during the growth and atresia of ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 24: 105-113.

CARSON, R.S., L.A. SALAMONSEN et J.K. FINDLAY. 1986. Permeability of rat ovarian follicles to LH during development and luteinization. *J. Reprod. Fert.* 76: 663-676.

CHOUDARY, J.F., H.T. GIER et G.B. MARION. 1968. Cyclic changes in bovine vesicular follicles. *J. Anim. Sci.* 27: 468.

de Jong, F.H. et R.M. SHARPE. 1976. Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid. *Nature, Lond.* 263.: 71-72.

de la Sota, R.L., F.A. Simmen et W.W. Thatcher. 1995. Integration of endocrine and molecular responses in bovine follicles by stepwise regression and correlation analysis. *Soc. Study. Reproduct.* 28th Annual Meeting, California p.157. Abstr. 403.

DESAULNIERS, D. 1995. Développement folliculaire et concentrations de la LH, de la FSH, de la progestérone et de l'estradiol durant un cycle estral synchronisé, pendant et après la suroovulation chez des vaches âgées et des taures démontrant des réponses surovulatoires différentes. Thèse de Ph.D. Centre de recherche en reproduction animale et Faculté de médecine, Université de Montréal (Québec, Canada).

DIZEREGA, G.S., R.P. MARRS, J.D. CAMPEAU et O.R. KLING. 1982. Human granulosa cell secretion of protein(s) which suppress follicular response to gonadotropins. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 56(1): 147-155.

DiZEREAGA, G.S., R.P. MARRS, P.C. ROCHE, J.D. CAMPEAU et O.R. KLING. 1983. Identification of protein in pooled human follicular fluid which suppress follicular response to gonadotrophins. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56: 35-41

DRIANCOURT, M.A. 1991. Follicular Dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* 35(1): 55-79.

DRIANCOURT, M.A., J.C. MARIANA et E. PALMER. 1981. A rapid technique for the histological examination of large ovarian follicles. *Reprod. Nutr. Develop.* 21(3): 371-375.

DUFOUR, J. H.L. WHITMORE, O.J. GINTHER et L.E. CASIDE. 1972. Identification of the ovulating follicle by its size on different days of the estrous cycle in heifers. *J. Anim. Sci.* 34: 85-87.

DUFOUR, J. J., L. P. CAHILL et MAULEON. 1979. Short and long term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy and ovarian follicular populations in sheep. *J. Reprod. Fert.* 57: 301-309.

DUFOUR, J.J. et G.L. ROY. 1985. Distribution of ovarian follicular populations in the dairy cow within 35 day after parturition. *J. Reprod. Fert.* 73: 229-235.

ENGLAND, B.G., H.J. KARAVOLAS, E.R. HAUSER et L.E. CASIDA. 1973. Ovarian follicular estrogens in Angus heifers. *J. Anim. Sci.* 37: 1176-1179.

FLETCHER, P.W., J.A. DIAS, M.A. SANZO et L.E. REICHERT, Jr. 1982. Inhibition of FSH action on granulosa cells by low molecular weight components of follicular fluid. *Molecular and cellular Endocrinology* 25: 303-315.

FORTUNE, J. E. et W. HANSEL. 1985. Concentration of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation. *Biol. Reprod.* 32: 1069-1079.

FORTUNE, J.E. 1986. Bovine theca and granulosa cells interact to promote androgen production. *Biol. Reprod.* 35: 292-299.

FORTUNE, J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50: 225-232.

FORTUNE, J.E. et W. HANSEL. 1979. The effect of 17 $\beta$ - estradiol on progesterone secretion by bovine theca and granulosa cells. *Endocrinol.* 104: 1834.

FORTUNE, J.E., J. SIROIS et S.M. QUIRK. 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. *Theriogenology* 29(1): 95-109.

GINTHER, O.J., J.P. KASTELIC et L. KNOPF. 1989. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology* 32(5): 787-795.

GINTHER, O.J., J.P. KASTELIC et L. KNOPF. 1989b. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *An. Reprod. Sci.* 20: 187-200.

GLENCROSS, R.G., E.C.L. BLEACH, B.J. McLEOD, A.J. BEARD et P.G. KNIGHT. 1992. Effect of active immunization of heifers against inhibin on plasma FSH concentrations, ovarian follicular development and ovulation rate. *Journal of Endocrinology* 134: 11-18.

GOODMAN, A.L. et G.D. HODGEN. 1983. The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog. Horm. Res.* 39: 1-73.

GOSLING, J.P., P. MORGAN et J.M. SREENAN. 1977. In: Control of reproduction in the cow. (J.M. Screenan ed.) Martinus, Nijhoff, Boston. pp. 225-236

GRASSO, F., L.A. GUILBAULT, G.L. ROY et J.G. LUSSIER. 1989. Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-p at the beginning of the estrous cycle. *Theriogenology* 31(6): 1209-1220.

GRIMES, R., J. LEIGHTON, J. BARBER, S. CUNNING et J. HAMMOND. 1992. Secretion of insulin-like growth factor-binding proteins by an ovarian-granulosa cell line. *Biol. Reprod.* 46(Suppl.1) Abstr. 362. p.141.

GRIMES, R.W., P. MATTON et J.J. IRELAND. 1987. A comparison of histological and non-histological indices of atresia and follicular function. *Biol. Reprod.* 37: 82-88.

GUILBAULT, L.A., F. GRASSO, J.G. LUSSIER, P. ROUILLIER et P. MATTON. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of dominant follicle. *J. Reprod. fert.* 91: 81-89.

GUILBAULT, L.A., P. ROUILLIER et P. MATTON. 1992. In vitro release and level of atresia of subordinate follicles collected during the growing or regressing phase of follicular dominance in cattle. *Theriogenology* 37 (Abstr): 218.

GUILBAULT, L.A., P. ROUILLIER, P. MATTON, R.G. GLENCROSS, A.J. BEARD et P.G. KNIGHT. 1993. Relationships between the level of atresia and inhibin contents ( $\alpha$  subunit and  $\alpha$ - $\beta$  dimer) in morphologically dominant follicles during their growing and regressing phases of development in cattle. *Biol. Reprod.* 48: 268-276.

HAMMOND, J.M., J.A. BARBER, S.F. CANNING et H.D. GUTHRIE. 1992. Expression of insulin-like growth factor binding proteins-4 and -5 during the growth of porcine ovarian follicles. Biol. Reprod. 46(Suppl.1) Abstr. 140. p.85.

HANSEL, W. et E.M. CONVEY. 1983. Physiology of the estrous cycle. Journal of Animal Science 57(Suppl.2): 404-424.

HAY, M.F. et R.M. MOOR. 1978. Changes in the graafian follicle population during the follicular phase of oestrous cycle. in control of ovulation. p. 177-196. Ed. Crighton, Butterworths, Toronto. 492p.

HENDERSON, K.M. et P. FRANCHIMONT. 1981. Regulation of inhibin production by bovine ovarian cells. J. Reprod. Fert. 63: 431-442.

HENDERSON, K.M., A.S. McNEILLY et I.A. SWANSTON. 1982. Gonadotrophin and steroid concentrations in bovine follicular and their relationship to follicle size. J. Reprod. Fert. 65: 467-473.

HENDERSON, K.M., K.P. McNATTY, L.E. O'KEEFFE, S. LUN, D.A. HEATH et M.D. PRISK. 1987. Differences in gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production by granulosa cells from Boorola X Merino ewes which were homozygous, heterozygous or non-carriers of a fecundity gene influencing their ovulation rate. J. Reprod. Fert. 81: 395-402.

HENDERSON, K.M., K.P. McNATTY, P. SMITH, M. GIBB, L.E. O'KEEFE, S. LUN, D.A. HEATH et M.D. PRISK. 1987. Influence of follicular health on the steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells *in vitro*. J. Reprod. Fert. 79: 185-193.

HENDERSON, K.M., L.E. KIEBSON, K.P. McNATTY, S. LUN et D.A. HEATH. 1984. [<sup>125</sup>I]-hCG binding to bovine thecal tissue from healthy and atretic antral follicles. Mol. Cell. Endocrinol. 34: 91-98.

HUHTINEN, M., V. RAINIO, J. AALTO, P. BREDBACKA et A.M. TANILA. 1992. Increased ovarian response in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. Theriogenology 37(2): 457-463.

HUTZ, R.J. 1989. MINIREVIEW. Disparate effect of estrogens on *in vitro* steroidogenesis by mammalian and avian granulosa cells. Biol. Reprod. 40: 709-713.

IRELAND, J.J. 1987. Control of follicular growth and development. J. Reprod. Fert. Suppl. 34: 39-54.

IRELAND, J.J. et J.F. ROCHE. 1982. Development of antral follicles in cattle after prostaglandin-induced luteolysis: change in serum hormones, steroids in follicular fluid, and gonadotropin receptors. *Endocrinology* 111: 2077-2086.

IRELAND, J.J. et J.F. ROCHE. 1983a. Development of non ovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology* 112: 150.

IRELAND, J.J. et J.F. ROCHE. 1983b. Growth and differentiation of large antral follicles after spontaneous luteolysis in heifers: changes in concentration of hormones in follicular fluid and specific binding of gonadotropins to follicles. *J. Anim. Sci.* 57: 157-167.

IRELAND, J.J. et J.F. ROCHE. 1987. Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine estrous cycle. In: *Follicular growth and ovulation rate in farm animals*. Ed.: J.F. Roche and D. O'Callaghan, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 1-18.

IRELAND, J.J., A.D. CURATO et J. WILSON. 1983. Effect of charcoal-treated bovine follicular fluid on secretion of LH and FSH in ovariectomized heifers. *J. Anim. Sci.* 57(6) 1512-1516.

IRELAND, J.J., R.L. MURPHEE et P.B. COULSON. 1980. Accuracy of predicting stages of the estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J. Dairy Sci.* 63: 155.

IRELAND, J.L.H. et J.J. IRELAND. 1994. Changes in expression of inhibin/activin  $\alpha$ ,  $\beta_A$  and  $\beta_B$  subunit messenger ribonucleic acid following increases in size and during different stages of differentiation or atresia of non-ovulatory follicles in cows. *Biol. Reprod.* 50: 492-501.

IRELAND, J.L.H., T.E.M. GOOD, P.G. KNIGHT et J.J. IRELAND. 1994. Alteration in amounts of different forms of inhibin during follicular atresia. *Biol. Reprod.* 50: 1265-1276.

JOLLY, P.D., D.J. TISDALL, D.A. HEATH, S. LUN et K.P. McNATTY. 1994. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroids synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. 51: 934-944.

KASTELIC, J.P., J.C.H. KO et O.J. GINTHER. 1990. Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. *Theriogenology* 34: 499-509.

KASTELIC, J.P., L. KNOFF et O.J. GINTHER. 1989. Follicular dynamics and temporal associations among ovarian events in heifers. *Journal of Dairy science* 72(supl. 1): 332-333 (Abstr. 808).

KLING, O.R., P.C. ROCHE, J.D. CAMPEAU, K. NISHIMURA, R.M. NAKAMURA et G.S. DiZEREGA. 1984. Identification of a porcine follicular fluid fraction which suppress follicular response to gonadotropins. *Biol. Reprod.* 30: 564-572.

KNOPF, L., J.P. KASTELIC, E. SCHALLEMBERGER et O.J. GINTHER. 1989. Ovarian follicular dynamic in heifers: test of two waves hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domestic Animal Endocrinology* 6(2): 111-119.

KO, J.C.H., J.P. KASTELIC, M.R. DELCAMPO et O.J. GINTHER. 1991. Effect of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J. Reprod. Fert.* 91: 511-519.

KRUIP, Th.A.M. et S.J. DIELEMAN. 1985. Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrus cycle. *Theriogenology* 24(4): 395-408.

KRUIP, Th.A.M. et S.J. DIELEMAN. 1989. Intrinsic and extrinsic factors influencing steroid production *in vitro* by bovine follicles. *Theriogenology* 31(3): 531-545.

KRUIP, Th.R.A.M. et S.J. DIELEMAN. 1982. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod. Nutr. Develop.* 22(3) 465-473.

LACROIX, E.W., W. ECHAUTE et J. LEUSEN. 1974. The biosynthesis of estrogen by the cow follicle. *Steroid* 23: 337-356.

LONGTON, R.E.G. et D.T. ARMSTRONG. 1994. In « The physiology of reproduction », edited by Knobil and J.D. Niel. Raven Press, Lrt., NewYork.

LAVOIR, M.C. et J.E. FORTUNE. 1990. Follicular dynamics in heifers after injection of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  during the first wave of follicular development. *Theriogenology* 33: 270 (Abstr.).

LING, N.C., X.-J. LIEU, M. MALKOWSKI, G. ERICKSON et S. SHIMASAKI. 1992. Structural and functional studies of IGFBPs in the ovary. IX ovarian workshop ovarian cell interactions: Genes to physiology, July 9-11. 1992. Serono Symposia, USA, p. 15.

LOBEL, B.L. et LEVY. 1968. Enzymatic correlated development secretory function and regression of follicles and corpora lutea in the bovine ovary. Part 3: Follicular atresia. *Acta. Endocrinol.* 132(suppl.): 53-63.

LUSSIER, J.G. et T.D. CARRUTHERS. 1989. Endocrine and superovulatory responses in heifers pretreated with FSH or bovin follicular fluid. *Theriogenology*: 31: 779-794.



LUSSIER, J.G., P. MATTON et J.J. DUFOUR. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. J. Reprod. Fert. 81: 301-307.

LUSSIER, J.G., P. MATTON, L.A. GUILBAULT, F. GRASSO, R.J. MAPLETOFT et T.D. CARRUTHERS. 1994. Ovarien follicular development and endocrine responses in follicular fluid-treated and hemiovariectomized heifers. J. Reprod. Fert. 102: 95-105.

MANN, G.E., B.K. CAMPBELL, A.S. McNEILLY et D.T. BAIRD. 1992. The role of inhibin and estradiol in the control of FSH secretion in the sheep. Journal of Endocrinology 133: 381-391.

MARIANA, J.C., D. MONMIAUX, M.A. DRIANCOURT et P. MAULEON. 1991. Folliculogenesis In: Reproduction in Domestic Animals. Fourth edition, Eds: Perry T. Cupps, Californie. pp. 119-171.

MARION, G.B., H.T. GIER et J.B. CHOUDARY. 1968. Micromorphology of bovine ovarian follicular system. J. Anim. Sci. 27: 451-465.

MARTIN, G.B., C.A. PRICE, J.C. THIERY et R. WEBB. 1988. Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. J. Reprod. Fert. 82: 319-328.

MARTIN, Y.L. 1986. Caractérisation et étude de l'atrésie folliculaire chez le bovin. Thèse de Ph.D. Faculté des sciences, Université de Sherbrooke (Québec, Canada).

MATTON, P., J. BHEREUR et J.J. DUFOUR. 1977. Morphology and responsiveness of the two largest ovarian follicles in anestrus ewes. Can. J. Anim. Sci. 57: 459-464.

MATTON, P., V. ADELAKOUN, Y. COUTURE et J.J. DUFOUR. 1981. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. J. Anim. Sci. 52(4): 813-820.

MAURASSE, C., P. MATTON et J.J. DUFOUR. 1985. Ovarian follicular populations at two stages of an estrous cycle in heifers given high energy diets. J. Anim. Sci. 61: 1194-1200.

McLEOD, B.J., M.G. HUNTER, E.C.L. BLEACH, R.G. GLENCROSS et J.H.M. WRATHALL. 1992. Preovulatory follicle development and luteal function in ewes immunized against a synthetic peptide sequence of the  $\alpha$  subunit of bovine inhibin. Journal of Endocrinology 133: 413-419.

McNATTY, K.P., C. DOBSON, M. GIBB, L. KIEBOOM et D.C. THURLEY. 1981. Accumulation of luteinizing hormone, oestradiol and androstenedione by sheep ovarian follicles *in vivo*. J. Endocrinol. 91: 99-109.

McNATTY, K.P., D.A. HEATH, K.M. HENDERSEN, S. LUN, P.R. HURST, L.M. ELLIS, G.W. MONTGOMERY, L. MORRISON et D.C. THURLEY. 1984a. Some aspects of thecal and granulosa cell function during follicular development in the bovine ovary. *J. Reprod. Fert.* 72: 39-53.

McNATTY, K.P., D.A. HEATH, S.L. LUN, J.M. FANNIN, J.M. McDIARMID et K.M. HENDERSEN. 1984b. Steroidogenesis by bovine theca interna in an *in vitro* perfusion systems. *Biol. Reprod.* 30: 159-170.

McNATTY, K.P., S. LUN, D.A. HEATH, L.E. KIEBOOM et K.M. HENDERSON. 1985. Influence of follicular atresia on LH-induced cAMP and steroid synthesis by bovine theca interna. *Mol. Cell. Endocrinol.* 39: 209-215.

McNEILLY, A.S. et J.M. WALLACE. 1987. The effect of follicular fluid on ovulation rate in the ewe. In: *Follicular growth and ovulation rate in farm animals*. Eds : J.F. Roche and D. O'Callaghan Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 119-127.

MERZ, E.A., E.R. HAUSER et B.G. ENGLAND. 1981. Ovarian function in the cycling cow: Relationship between gonadotropin binding to theca and granulosa and steroidogenesis in individual follicles. *J. An. Sci.* 52: 1457-1468.

MILLER, K.F., J.K. CRISTER, R.E. KOWE et O.J. GINTHER. 1979. Ovarian effects of bovine follicular fluid treatment in sheep and cattle. *Biol. Reprod.* 21: 537-544.

MONNIAUX, D. 1982. Thèse de Doctorat. Paris..

MONNIAUX, D., J.C. MARIANA et W.R. GIBSON. 1984. Action of PMSG on follicular populations in the heifer. *J. Reprod. Fert.* 70: 243-253.

MONTZ, F.J., E.L. UJITA, J.D. CAMPEAU et G.S. DiZEREGA. 1984. Inhibition of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin binding to porcine granulosa cells by a follicular fluid protein(s). *Am. J. Obstet. Gynecol.* 148: 436-441.

MOOR, R.M., A.M. KRUIP et D. GREEN. 1984. Introovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? *Theriogenology* 21: 103-115.

MOOR, R.M., M.F. HAY, H.M. DOTT et D.G. GRAN. 1978. Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J. Endocr.* 77: 309-318.

MURPHY, M.G., W.J. ENRIGHT, M.A. CROWE, K. McCONNELL, L.J. SPICER, M.P. BOLAND et J.F. ROCHE. 1991. Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J. Reprod. Fert.* 92: 333-338.

NANDEDKAR, T.D.; J.K. SHAHID et S.D. KHOLKUTE. 1992. Ovarian regulation by human ovarian follicular fluid in bonnet monkeys. *Biol. Reprod.* 46 (suppl.): Abstr. 212, pp103.

NETT, T.M. 1987. Function of hypothalamic-hypophyseal axis during the post partum period in ewes and cows. *J. Reprod. Fertil.* 34: 201-213.

ONO, T., J.D. CAMPEAU, E.A. HOLMBERG, R.M. NAKAMURA, E.L. UJITA, D.L. DEVEREAUX, S.A. TONELTA, R. DEVINNA, M. UGALDE et G.S. DIZEREGA. 1986. Biochemical and physiologic characterization of follicle regulatory protein: a paracrine regulator of folliculogenesis. *Am. J. Abstr. Gynecol.* 154: 709-716.

PETERS, A.R. et P.J.H. BALL. 1987. The ovarian cycle. In: *Reproduction in cattle*. Eds Butterworth and Co. Toronto. Pp. 20-39.

PICTON, H.M., C.G. TSONIS et A.S. McNEILLY. 1990. FSH causes a time dependant stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin releasing hormone agonist. *J. Endocr.* 126: 297-307.

PIERSON, R.A. et O.J. GINTHER. 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21(3): 495-504.

PIERSON, R.A. et O.J. GINTHER. 1986. Ovarian follicular population during early pregnancy in heifers. *Theriogenology* 26(5): 649-659.

PIERSON, R.A. et O.J. GINTHER. 1987a. Follicular populations during the Estrous cycle in heifers. Influence of day. *Animal Reproduction Science*. 14: 165-176.

PIERSON, R.A. et O.J. GINTHER. 1987b. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. II Influence of right and left sides and intraovarian effects of the corpus luteum. *Animal reprod. Science* 14: 177-186.

PIERSON, R.A. et O.J. GINTHER. 1988a. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology* 29(1): 21-37.

PIERSON, R.A. et O.J. GINTHER. 1988b. Follicular population during the estrous cycle in heifers. III Time of selection of the ovulatory follicle. *Anim. Reprod. Sci.* 16: 81-95.

PRICE, C.A. et R. WEBB. 1988. Steroids control of gonadotropin secretion and ovarian function in heifers. *Endocrinology* 122: 2222-2231.

PRIEDKALNS, J. et A. F. WEBER. 1968. Ultrastructure studies of the bovine graafian follicle and corpus luteum. *Zeitschrift für Zellforschung*. 91: 554-573.

QUIRK, S.M. et J.E. FORTUNE. 1986. Plasma concentrations of gonadotrophins, preovulatory follicular development and luteal function associated with bovine follicular fluid-induced delay of oestrus in heifers. *J. Reprod. Fert.* 76: 609-621.

QUIRK, S.M., G.J. HICKEY et J.E. FORTUNE. 1986. Growth and regression of ovarian follicles during the follicular phase of the oestrous cycle in heifers undergoing spontaneous and PGF-2 $\alpha$ -induced luteolysis. *J. Reprod. Fert.* 77: 211-219.

RAJAKOSKI, E.V. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal and left-right variations. *Acta Endocrinologica* 52(suppl.): 1-68.

REICHERT, L.E., J.R. MICHAELL, A. SANZO et M.S. DARGA. 1979. Studies on a low molecular weight follicle-stimulating hormone binding inhibitor from human serum. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 49(6): 866-872.

RICHARDS, J.S. 1980. Maturation of ovarian follicles: action and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiology Reviews.* 60.: 51-89.

RIVIER, C. et W. VALE. (1991). Effect of recombinant inhibin on follicle inhibin stimulating hormone secretion by female rat: interaction with a gonadotropin-releasing hormone antagonist and estrogen. *Endocrinology.* 129: 2160-2165.

ROBERTSON, D.M., M. PRISK, J.W. McMASTER, D.C. IRBY, J.K. FINDLAY et D.M. de KRETZER. (1991). Serum FSH-suppressing activity of human recombinant inhibin A in male and female rat. *J. Reprod. Fert.* 91: 321-328.

ROUILLIER, P. 1991. Influence du statut ovarien sur le développement folliculaire en superovulation chez la vache. Mémoire de maîtrise. Faculté des sciences, Université de Sherbrooke (Québec, Canada).

ROUILLIER, P., L.A. GUILBAULT, J.G. LUSSIER et P. MATTON. 1996. Changes in morphological appearance and functional capacity of recruited follicles in cows treated with FSH in the presence or absence of a dominant follicle. *Theriogenology* 46 (6): 1053-1061.

ROUILLIER, P., P. MATTON, M.A. SIRARD, V. LUU-THE et L.A. GUILBAULT. 1995. Effect of addition of bovine follicular fluid on 17 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase activity of bovine granulosa cells cultured in vitro. *Soc. Study Reprod. 28th Annu. Meet. Abstr.* 401. p. 157.

SAMARAS, S.E. et J.M. HAMMOND. 1992. Inhibitory actions of recombinant IGFBP-3 on the function of cultured porcine granulosa cells. IX ovarian workshop cell interactions: Genes to physiology, July 9-11. 1992. Serono symposia, USA. *Abstr* 66 p.53.

S.A.S. 1989. S.A.S Users's Guide: Statistics. Statistical Analysis System Institute., INC., Cary, NA.

SAUMANDE, J. 1991. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum- free medium: The effect of insulin and fibronectin on hte response to FSH. J. Steroid. Biochem. Molec. Biol. 38(2): 189-196.

SAUMANDE, J., D. CHUPIN, J.C. MARIANA, R. ORTAVANT et P. MAULEON. 1978. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation. In: Control of reproduction in the cow, pp. 195-225. J.M. Sreenan (Ed.) Martinus Nijhoff Publishers, Drodrecht

SAVIO, D.J., L. KEENAN, M.P. BOLAND et J.F. ROCHE. 1988. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. J. Reprod. Fert. 83: 663-671.

SCOTT, R.S., H. QUIGG, A.O. TROUNSON, C.G. TSONIS et J.K. FINDLAY. 1980. Inhibin in ovine follicular fluid. Proc. Endocr. Soc. Aus. 23: 67.

SCREENAN, J.M., D. MORRIS, A. TAIT et M.G. DISKIN. 1987. Manipulation of the immune system to increase ovulation rate in the cow. In: Follicular growth and ovulation rate in farm animals. Eds.: J.F. Roche and D.O'Callaghan, Martimis Nijhoff Publishers Dordrecht, 73-86.

SIROIS, J. et FORTUNE J.E. 1988. Ovarian follicular dynamics during estrous cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. Biol. Reprod. 39: 308-317.

SIROIS, J. et J.E. FORTUNE. 1990. Monitoring ovarian follicular development in cattle by ultrasound imaging a1990 up date. Emlayo transfer News letter 8(4).

SLUSS, P.M. et L.E. REICHERT Jr. 1984. Porcine follicular fluid contains several low molecular weight inhibitors of follicle stimulating hormone binding to receptor. Biol. Reprod. 30: 1091-1104.

SLUSS, P.M., P.W. FLETCHER et L.E. REICHERT Jr. 1983. Inhibition of <sup>125</sup>I-human follicle-stimulating hormone binding to receptor by a low molecular weight fraction of bovine follicular fluid: Inhibitor concentration is related to biochemical parameters of follicular development. Biol. Reprod. 29: 1105-1113.

SPICER, L.J., P. MATTON, S.E. ECHTERNKAMP, E.M. CONVEY et H.A. TUCKER. 1987. Relationships between histological signs of atresia, steroids in follicular fluid and gonadotropin binding in individual bovine antral follicles during postpartum anovulation. Biol. Reprod. 36: 890-898.

- SPICER, L.J., S.E. ECHTERNKAMP, S.F. CANNING et J.M. HAMMOND. 1988. Relationship between concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in follicular fluid and various biochemical markers of differentiation in bovine antral follicles. *Biol Reprod* 39: 573-580.
- STAIGMILLER, R.B. et B.G. ENGLAND, R. WEBB, R.E. SHORT et BELLOWS. 1982. Estrogen secretion and gonadotropin binding by individual bovine follicles during estrus. *J. Anim. Sci.* 55: 1473-1482.
- STAIGMILLER, R.B. et B.G. ENGLAND. 1982. Folliculogenesis in the bovine. *Theriogenology* 17(1): 43-52.
- SUNDERLAND, S.J., M.A. CROWE, M.P. BOLAND, J.F. ROCHE et J.J. IRELAND. 1994. Selection, dominance, and atresia of follicles during the estrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fert.* 101: 547-555.
- TAKAGI, M., T. TSUKIHARA, Y. NISHIKAT et T. SUZUKI. 1993. Relationship between progesterone and estradiol contents of follicular fluid and the morphological appearance of granulosa cells of follicles coexisting with corpora lutea in bovine ovaries. *Theriogenology* 40: 135-147.
- TERQUI, M., F. BERTHELOT et M.D. DRIANCOURT. 1988. Morphological and functional features of ovine follicles in perfusion with pulsatile delivery. *Reprod. Nutri. Develop.* 28(48): 1093-1104.
- TSONIS, C.G., H. QUIGG, W.W.K. LEE, L. LEVERSHA, A.O. TROUNSON et J.K. FINDLAY. 1983. Inhibin in individual follicles in relation to diameter and atresia. *J. Reprod. Fert.* 67: 83-90.
- TSONIS, C.G., L.P. CAHILL, R.S. CARSON et J.K. FINDLAY. 1984. Identification at the onset of luteolysis of follicles capable of ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 70: 609-614.
- TURZILLO, A.M. et J.E. FORTUNE. 1990. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. *J. Reprod. Fert.* 89: 643-653.
- TURZILLO, A.M. et J.E. FORTUNE. 1992. Estradiol production by dominant and subordinate follicle during the first wave of follicular development in cattle. IX ovarian workshop ovarian cell interactions. *Genesto Physiology*, July 9-11. 1992. Sero Symposia, USA, Abstr 85. p.63.
- WELSCHEN, R., W.P. HERMAN, J. DULLART et F.H. DE JONG. 1977. Effects of an inhibin like growth factor present in bovine and porcine follicular fluid on gonadotrophin levels in ovariectomized rats. *J. Reprod. Fert.* 50: 129-131.

WELSCHEN, R., W.P. HERMANS, J. DULLAART et F.H. de JONG. 1977. Effects of an inhibin-like factors present in bovine and porcine follicular fluid on gonadotropin levels in ovariectomized rats. J. Reprod. Fert. 50: 129-131.

WISE, T., M.W. VERNON et R.R. MAURER. 1986. Oxytocin, Prostaglandins E and F, Estradiol, progesterone, sodium, and potassium in preovulatory bovine follicles either developed normally or stimulated by follicle stimulating hormone. Theriogenology 26(6): 757-778.

WRATHALL, J.H.M., B.J. McLEOD, R.G. GLENCROSS, A.J. BEARD et P.G. KNIGHT. 1990. Inhibin immunoneutralization by antibodies raised against synthetic peptide sequences of inhibin  $\alpha$  subunit: effects of gonadotrophin concentrations and ovulation rate in sheep. Journal of Endocrinology 124: 167-176.

ZELEZNIK, A.J., H.M. SCHULER et L.E. Jr REICHERT. 1981. Gonadotrophin-binding sites in the Rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. Endocrinology 109: 356-361.

ZELEZNIK, A.J., S.G. HILLIER, et G.T. ROSS. 1979. Follicle stimulating hormone-induced follicular development: An examination of the role of androgens. Biol. Reprod. 21: 673-681.

ZHANG, L., E.G. BLAKEWOOD, R.S. et R.A. GODKE. 1991. The effect of insulin on maturation and development of *in vitro*-fertilized bovine oocytes. Theriogenology 35: 301.

ZIMMERMANN, R.C., G. WESTOHOF, M. HOEDEMAEKER, E. GRUNERT ET W. BRAENDLE. 1988. Is follicular fluid content representative of follicular steroid secretion.

ZIMMERMAN, R.C., G. WESTHOL, I. PEUKERT-ADAM, M. HOEDEMAEKER, E. GRUNERT et W. BRAENDLE. 1987. *In vitro* steroid secretion of tertiary atretic bovine follicles in a superfusion system correlated to their histological features. Human Reproduction 2(6): 457-461.

ZIMMERMAN, R.C., W.S. WUN, R.K. TCHOLAKIAN, L.J. RODRIGUEZ-RIGAU, W. BRAENDLY et E. STEINBERGER. 1985. *In vitro* steroid secretion by intact bovine follicles in a superfusion system. Horm. Metab. Res. 17: 458-463.